

Polymer-Keramik-Kompositmaterialien als Knochenersatz und die Wechselwirkung von Nanopartikeln mit Biomolekülen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Sven Backhaus

geboren in Wesel

Institut für Anorganische Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2009 bis September 2013 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 31.01.2014

Gutachter: Prof. Dr. Matthias Epple
Prof. Dr. Christian Mayer

Vorsitzender: Prof. Dr. Torsten C. Schmidt

„Alles, was die Natur selbst anordnet, ist zu irgendeiner Absicht gut. Die ganze Natur überhaupt ist eigentlich nichts anderes, als ein Zusammenhang von Erscheinungen nach Regeln; und es gibt überall keine Regellosigkeit.“

Immanuel Kant

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	8
1.1. Knochenersatzmaterialien	8
1.2. Nanotechnologie	10
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	13
2.1. Knochen.....	13
2.2. Biomaterialien	15
2.2.1. Knochenersatzmaterialien	15
2.2.2. Anforderungen an den modernen Knochenersatz und Biomaterialien....	16
2.2.3. Bioresorbierbare Polymere und Kompositmaterialien.....	18
2.2.4. Porosität, poröse Materialien und Porogene.....	21
2.2.5. Osteomyelitis und kontrollierte Wirkstofffreisetzung	23
2.3. Grundlagen der Kolloidchemie.....	27
2.3.1. Eigenschaften kolloidaler Systeme	27
2.3.2. DLVO-Theorie und die Stabilisierung von Kolloiden	29
2.3.3. Zetapotential	31
2.3.4. Alterung kolloid-disperser Systeme	33
2.4. Siliciumdioxidnanopartikel.....	34
2.4.1. Eigenschaften von Siliciumdioxidnanopartikeln	34
2.4.2. Anwendung von Siliciumdioxidnanopartikeln	35
2.5. Adsorption an Grenzflächen	37
2.5.1. Adsorption.....	37
2.5.2. Ausbildung einer Proteinkorona auf der Nanopartikeloberfläche	38
3. GERÄTE UND METHODEN.....	41
3.1. Rasterelektronenmikroskopie (REM)	41
3.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	42
3.3. Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)	42
3.4. Infrarotspektroskopie (IR)	43
3.5. UV-Vis-Spektroskopie (UV/Vis).....	44
3.6. Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	45
3.7. Thermogravimetrie (TG)	46
3.8. Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential.....	46

3.9. Analytische Scheibenzentrifugation (DCS)	48
3.10. Elementaranalyse (EA)	49
3.11. Röntgendiffraktometrie (XRD).....	50
3.12. Mechanische Untersuchungsmethoden.....	51
3.13. Verarbeitungsmethoden – Begasungsverfahren.....	54
3.14. Übersicht über die verwendeten Geräte	55
3.15. Übersicht der verwendeten Chemikalien und Materialien	56
4. EXPERIMENTELLER TEIL	57
4.1. Kompositmaterialien	57
4.1.1. Synthese der lösemittelbasierten Kompositmaterialien	57
4.1.2. Begasung der Kompositmaterialien in PTFE-Hohlformen	57
4.2. Adsorptionsexperimente	59
4.2.1. Synthese oberflächenfunktionalisierter Siliciumdioxid-Nanopartikel	59
4.2.2. Adsorption von Methylenblau, FITC-BSA und TRITC-BSA	59
5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION – KOMPOSITMATERIALIEN	61
5.1. Konzept.....	61
5.2. Charakterisierung der Kompositmaterialien	64
5.2.1. Charakterisierung der keramischen Phase	64
5.2.2. Charakterisierung der Kompositmaterialien	68
5.2.3. Charakterisierung der geschäumten Kompositmaterialien	74
5.3. Degradation der Kompositmaterialien.....	78
5.3.1. Stabilität des pH-Werts während der Degradation.....	80
5.3.2. Massenverluste und Puffer- bzw. Wasseraufnahme.....	82
5.3.3. Glasübergangstemperaturen der Kompositmaterialien.....	86
5.3.4. Morphologie der degradierten Kompositmaterialien	89
5.4. Mechanische Kenngrößen der Kompositmaterialien.....	92
5.4.1. Mechanische Kenngrößen der trockenen Kompositmaterialien.....	93
5.4.2. Mechanische Kenngrößen der Kompositmaterialien	95
5.5. Aufschäumen großvolumiger Probekörper	98
5.5.1. Explosionsartige Schäumung des Kompositmaterials	99
5.5.2. Homogene Porosität großvolumiger Probekörper.....	103
5.5.3. Abhängigkeit der Porosität vom Hohlformmaterial.....	105
5.6. Generierung von Porosität im Kompositmaterial.....	107
5.6.1. Variation des Porositätsgrades ohne Porogenzusatz	109

5.6.2. Generierung von Porosität durch Porogene	112
5.6.3. Geschäumte Kompositmaterialien nach der Porogenentfernung	115
5.6.4. Porosität durch einen mechanischen Bohrprozess.....	119
5.7. Freies Aufschäumen in offenen PTFE-Formen.....	120
5.7.1. Konzept des freien Aufschäumens	120
5.7.2. Freies Aufschäumen der Kompositmaterialien	122
5.7.3. Freies Schäumen mit variabler Dekompressionsrate	125
5.8. Kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs Gentamycin.....	127
5.8.1. Freisetzungskinetik von Gentamycin	127
5.8.2. Schäumungsverhalten des Kompositmaterials mit Gentamycin	130
5.8.3. Mechanische Kenngrößen des mit Gentamycin beladenen Komposits	131
5.9. Zusammenfassung – Kompositmaterialien	133
6. ERGEBNISSE UND DISKUSSION – ADSORPTIONSEXPERIMENTE.....	137
6.1. Konzept.....	137
6.2. Charakterisierung der Siliciumdioxid-Nanopartikel.....	140
6.2.1. Größe der Partikel	140
6.2.2. Morphologie der Partikel.....	142
6.3. Charakterisierung der mit Sulfonsäuregruppen funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel	144
6.3.1. Größe der Partikel	144
6.3.2. Morphologie der Partikel.....	145
6.4. Oberflächenchemie und kolloidale Eigenschaften	148
6.5. Adsorption an funktionalisierten Siliciumdioxid-Partikeln	155
6.5.1. Adsorption von Methylenblau bei einem pH-Wert von 2	159
6.5.2. Adsorption von Methylenblau bei einem pH-Wert von 7	160
6.5.3. Adsorption von FITC-BSA bei einem pH-Wert von 2	162
6.5.4. Adsorption von FITC-BSA bei einem pH-Wert von 7	164
6.5.5. Adsorption von TRITC-BSA bei einem pH-Wert von 2	166
6.5.6. Adsorption von TRITC-BSA bei einem pH-Wert von 7	167
6.6. Bedeckungsgrad der funktionalisierten Nanopartikel.....	169
6.7. Zusammenfassung und Diskussion der Adsorptionsexperimente	172
7. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	176
8. LITERATURVERZEICHNIS	179

9. ANHANG	192
9.1. Abkürzungsverzeichnis	192
9.2. Publikationsliste	194
9.3. Lebenslauf	195
9.4. Erklärung	197
9.5. Danksagungen.....	198

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Der erste Teil der Arbeit ist im materialwissenschaftlichen Bereich angesiedelt und thematisiert die Entwicklung und Charakterisierung innovativer, degradierbarer Polymer-Keramik-Komposite als Knochenersatzmaterialien. Der zweite Teil der Arbeit ist dem Bereich der Grenzflächen- und Kolloidchemie zuzuordnen. Dort steht die Wechselwirkung von funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikeln mit Biomolekülen im Fokus. Beiden Bereichen gemein ist die Thematik der Grenzflächenchemie.

1.1. Knochenersatzmaterialien

Im Bereich der Knochenersatzmaterialien zeichnet sich ein steigender Bedarf an adäquaten Biomaterialien für die Rekonstruktion des humanen Knochens ab. Der humane Knochen selbst ist ein höchst komplexes, von der Natur selbst optimiertes Kompositmaterial.^[1-3] Bei der Entwicklung entsprechender Biomaterialien ist der humane Knochen mit seinen biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften als Vorbild von großer Bedeutung. Bis heute ist es nicht möglich, eine exakte Reproduktion des natürlichen Knochens zu realisieren. Insbesondere ist die Biokompatibilität neuentwickelter Biomaterialien zu beachten, da diese vom menschlichen Gewebe toleriert und in das System integriert werden müssen.^[4] Auch die mechanische Stabilität von Biomaterialien muss gewährleistet sein.

Knochendefekte können unterschiedlichste Ursachen haben, wie beispielsweise Tumore, Frakturen, Knochentransplantate oder Segmentresektionen von infizierten Knochengewebe.^[5] Wenn Knochendefekte eine kritische Größe überschreiten, ist es notwendig, diese mit synthetischen Ersatzmaterialien aufzufüllen.^[5-15] Andernfalls kann Bindegewebe in den Defekt einwachsen und eine ausreichende knöcherne Konsolidierung der betroffenen Areale verhindern. Um eine Infektion im Implantationsgebiet zu vermeiden, ist es wünschenswert, synthetische Ersatzmaterialien mit antiinfektiös wirkenden Eigenschaften auszustatten.^[16-21] Der Einsatz von Antibiotika, wie beispielsweise Gentamycin, hat sich über die Jahre etabliert, u. a. auch zur gezielten Behandlung der Osteomyelitis.^[16, 18, 21-33] Als Goldstandard unter den Knochenersatzmaterialien gilt bis dato der autologe Knochenersatz, dieser ist aber limitiert durch die verfügbare Menge.^[7] Synthetische Knochenersatzmaterialien sollten biodegradierbar sein und das Einwachsen von Osteoblasten in die künstliche Matrix ermöglichen. Im Laufe der Zeit wird somit das

Biomaterial durch körpereigenen Knochen vollständig ersetzt.^[34] Eine weitere Rolle spielt die osteogene, osteokonduktive und osteoinduktive Aktivität von Knochenersatzmaterialien.^[7] Sie können auch als Träger für biologische Wirkstoffe, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, fungieren und den Heilungsverlauf und die Regeneration des umliegenden Knochengewebes synergetisch unterstützen.^[35-45] Aliphatische Polyester wie Polylactid, Polyglycolid und ihre Copolyester stellen die Klasse der synthetischen organischen Knochenersatzmaterialien dar und sind ebenfalls im Bereich des *tissue engineering*s von großer Relevanz.^[46-56] Die bei der Degradation freiwerdenden sauren Monomere der Esterhydrolyse können durch basische Verbindungen gepuffert werden. Calciumcarbonat und Calciumphosphat sind typische Beispiele und weisen eine hohe Biokompatibilität auf. Sie werden mit dem Polymer in unterschiedlichen Massenverhältnissen gemischt und finden als Kompositmaterial Anwendung im biomedizinischen Bereich.^[57-60] Calciumcarbonat kann in unterschiedlicher Form als Füllstoff für Polymercompounds verwendet werden.^[61]

In der vorliegenden Arbeit wird ein Kompositmaterial bestehend aus Poly-(*D,L*-Lactid) und Calcit als Knochenersatzmaterial untersucht. Hierbei unterscheidet sich das Kompositmaterial durch ein neues Compoundierungsverfahren und der sphärischen Morphologie der Calcit-Partikel deutlich von dem zuvor beschriebenen Kompositen von SCHILLER.^[57] Dabei spielt die Zusammensetzung des Materials und das Degradationsverhalten *in vitro* eine entscheidende Rolle. Weiter werden die mechanischen Eigenschaften durch etablierte Prüfverfahren erfasst und in Abhängigkeit von der Degradation dargestellt. Die Formkörper werden nach ISO-Norm angefertigt.^[62] Die Formkörper werden durch physikalisches Aufschäumen mit überkritischem Kohlenstoffdioxid erhalten und dienen als idealisiertes Modell eines porösen Implantatmaterials. Diese Methode ist im Bereich der Polymerverarbeitung fest etabliert.^[57, 60, 63-80] Des Weiteren wird der Einfluss veränderter Schäumungsbedingungen auf Morphologie und Porosität untersucht. Die Anwendung des Porogenverfahrens zur Generierung von Porosität innerhalb des geschäumten Materials durch unterschiedliche Porogene wird in einem weiteren Schritt analysiert.^[71, 81-87] Im letzten Teil der Arbeit geht es um die kontrollierte *in vitro*-Wirkstofffreisetzung des Antibiotikums Gentamycin als Modellsubstanz aus dem geschäumten Kompositmaterial.

1.2. Nanotechnologie

Nanopartikel sind in der Natur allgegenwärtig und rücken zunehmend in den Mittelpunkt der Forschung, dies wird durch die stark gestiegene Anzahl von Publikationen in den letzten Jahren deutlich. Der Begriff »Nano« stammt vom griechischen »Nanos« ab und bedeutet »Zwerg«.^[88] Ein Nanometer ist auf der Längenskala ein milliardstel Meter. Nanopartikel weisen dabei größenabhängige elektrische, optische, magnetische und chemische Eigenschaften auf, über die makroskopische Feststoffe nicht verfügen.^[89] Zerteilt man gedanklich ein makroskopisches Objekt auf nanoskalige Maßstäbe, so erhöht sich das Verhältnis von Oberfläche zur Volumenphase (*bulk*-Phase) deutlich und die Oberfläche wächst umgekehrt proportional zu den Kantenlängen der Teilchen.^[90] Die spezifische Oberfläche nanoskaliger Systeme ist um ein Vielfaches größer, wodurch sich die physikochemischen Eigenschaften drastisch verändern. Schon vor Beginn der aktuellen Forschung wurden Nanopartikel (Goldpurpur) hergestellt und für das Färben von Rubinglas verwendet.^[90] Obschon das Vorhandensein von Nanopartikeln im 18. Jahrhundert noch nicht nachgewiesen war, vermutete MACQUER in seinem *Dictionary of Chemistry*, dass fein verteiltes Gold in diesen Dispersionen vorkomme.^[90]

Kommerziell wird eine Vielzahl von nanopartikulären Produkten vertrieben, wobei sich vielfältige Möglichkeiten in den Bereichen der photonischen Kristalle, von Dünnschichten für elektronische Speicher, magnetische Flüssigkeiten, hochselektive Katalysatoren, Veredlung von Oberflächen, neuartigen Materialien zur Energiespeicherung, Kontrastmitteln für die medizinische Diagnostik bis hin zu grundsätzlich neuartigen Materialien wie Nanocontainern und Superkristallen ergeben.^[88] Im Bereich der Landwirtschaft, Nahrungsmitteltechnologie, Lebensmittelverarbeitung und Verpackung findet die Nanotechnologie vielfältige Anwendung.^[91] Auch Quantenpunkte rücken durch Funktionalisierung in den Fokus von Biologie und Biomedizin.^[92, 93] Die intrazelluläre Umgebung in biologischen Systemen kann durch fluoreszierende Nanopartikel untersucht werden.^[94] So können Nanopartikel auf ihrem Weg in die Zelle beobachtet werden und gezielt mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie dargestellt werden.^[95, 96] Im Bereich der Nanomedizin^[97-100] kommt dem *drug delivery*,^[101, 102] der gezielten Zelladressierung,^[103] der Oberflächenfunktionalisierung für nanomedizinische Anwendungen,^[104] dem nanopartikulären Transport von

Biomolekülen ins Zellinnere^[105], dem zellulärem *uptake*^[106-108] und der Krebsmedizin^[109] gesonderte Bedeutung zu.

Aufgrund der großen spezifischen Oberfläche nanoskaliger Systeme und der damit verbundenen hohen Oberflächenenergie, neigen derlei Systeme zur Adsorption von Ionen, Proteinen, Kohlenhydraten und Polymeren etc. auf ihrer Oberfläche. Bei der Proteinadsorption und Wechselwirkung spielen u. a. die Oberflächenchemie, die Proteinbindung und -faltung, das Zetapotential, die Desorption und der pH-Wert eine besondere Rolle.^[110-124] Dabei steht das komplexe Phänomen der Proteinadsorption auf festen Oberflächen ebenfalls in diversen Forschungsfeldern im Fokus der Wissenschaft.^[125, 126] In der Literatur wird auch die gezielte Reduktion der Proteinadsorption auf kolloidalen Siliciumdioxid-Partikeln durch eine Polymerhülle beschrieben.^[127] Als grundsätzliche Frage stellt sich, was mit Nanopartikeln passiert, die mit biologischen Systemen in Kontakt kommen. Die Wechselwirkung zwischen Proteinen und Nanopartikeln ist dabei der entscheidende Schritt.^[128-130] Treten Nanopartikel beispielsweise ins Blutplasma über, so kommt es zur Ausbildung einer Proteinkorona auf ihren Oberflächen.^[131-143] Diese Korona besteht aus selektierten Biomolekülen, die zu einer Verringerung der Oberflächenenergie beiträgt und sich in einem dynamischen Gleichgewicht befindet.

Da Nanopartikel kovalent modifiziert werden können, stellt sich auch die grundlegende Frage, welchen Einfluss diese Modifizierung auf die Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und Proteinen hat. Die Art und Charakteristik der Partikeloberfläche ist für die Wechselwirkung entscheidend. Am Beispiel von funktionalisierten Aluminiumoxid-Partikeln lässt sich die Proteinadsorption untersuchen.^[144, 145] Ergänzt man die geladene und kovalente Funktionalisierung (engl. *corona*) auf oxidischen Nanopartikeln durch eine elektrostatisch angebundene, organische Schicht (engl. *canopy*), so kommt man zur Substanzklasse der nanoskaligen, ionischen Materialien (NIMS).^[146-151] Dabei handelt es sich um nanopartikuläre Systeme, die denen der ionischen Flüssigkeiten ähneln.

Die Nanowissenschaft ist so vielfältig, dass sich weitreichende Visionen ergeben. Ob es sich dabei nur um einen Hype handelt oder ob die Nanotechnologie durch Erfindungen und Innovationen zur Lösung der Probleme unserer Zeit beitragen kann, wird sich in der Zukunft zeigen.^[152, 153] Bei der Erforschung und Verwendung nanopartikulärer Systeme bleibt aber auch die Frage offen, wie sich Nanopartikel in

der Umwelt verhalten^[154] und wie toxikologische Eigenschaften und Risiken für den Menschen beurteilt werden können.^[155-158]

In der vorliegenden Arbeit werden Siliciumdioxid-Nanopartikel durch kovalente Funktionalisierung mit Sulfonsäuregruppen organisch modifiziert (silanisiert), um sie als Modellsystem zur Untersuchung der Wechselwirkung mit Biomolekülen zu verwenden. Zunächst erfolgt die vollständige Charakterisierung der Siliciumdioxid-Nanopartikel in ihrer reinen Form sowie in ihrer funktionalisierten Form. In einem weiteren Schritt wird die Wechselwirkung der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel mit dem kationischen Molekül Methylenblau (MB), mit Fluoresceinisothiocyanat markiertem bovinem Serumalbumin (FITC-BSA) und mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat markiertem bovinem Serumalbumin (TRITC-BSA) untersucht. Von besonderem Interesse ist hierbei das Adsorptionsverhalten auf funktionalisierten Oberflächen, in Abhängigkeit vom Protein-zu-Partikel-Massen-Verhältnis. Bovines und humanes Serumalbumin sind Modellproteine und werden in der Wissenschaft gerne für Adsorptionsexperimente und diverse Fragestellungen verwendet. Dabei werden u. a. die Struktur in Lösung und Konformationsänderungen des Proteins bei Adsorptionsphänomenen untersucht.^[159-169] In Bezug auf die erwähnte Proteinkorona ist Serumalbumin besonders interessant, da es im Blutserum in großer Menge vorkommt und gut charakterisiert ist. Methylenblau ist hingegen ein kleines kationisches Molekül und wird zum Vergleich herangezogen. Die funktionalisierten Nanopartikel werden jeweils mit MB, FITC-BSA und TRITC-BSA in Kontakt gebracht und nach der Inkubation durch Ultrazentrifugation vom Überstand getrennt. Im Überstand lässt sich die Konzentration der drei „Farbstoffe“ mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmen. Aus der Kenntnis der theoretisch vorhandenen Masse und der im Überstand enthaltenen Masse kann der Adsorptionsgrad ermittelt werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Knochen

Beim Bewegungsapparat des Menschen übernimmt das Skelett den passiven Teil des motorischen Systems. Dieses Knochengerüst besteht aus ca. 212 einzelnen Knochen und ermöglicht dem Körper zusammen mit den Sehnen, Bändern und den Muskeln die freie Translation im Raum und stützt den gesamten Organismus.^[170] Um den deformierenden Kräften bei Beanspruchung standzuhalten, müssen Knochen hinreichend stabil sein. Neben den mechanischen Anforderungen erfüllt der Knochen auch eine Speicherfunktion für Calcium- und Phosphationen.^[3] Wenn der Calciumwert im Blut unter einen kritischen Wert fällt, können unter Kontrolle der osteotropen Hormone Parathormon und Calcitonin Calciumionen aus dem Knochengewebe freigesetzt werden.^[171]

Der Knochen ist ein von der Natur optimiertes Kompositmaterial, bestehend aus Calciumphosphat (ca. 70 Gew.-%^[172]) und organischer Matrix (ca. 30 Gew.-%^[172]). Calciumphosphat kommt dabei in Form von Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5[\text{PO}_4]_3\text{OH}$) und anderen Calciumphosphaten vor und verleiht dem Knochen eine hohe Festigkeit.^[171]

Der Knochenapatit kann dabei vom stöchiometrischen Hydroxylapatit abweichen und nanoskalige Kristallite aufweisen.^[173] Die organische Matrix besteht überwiegend aus Typ-1-Kollagen sowie verschiedenen Proteinen (Proteoglykanen) und knochenspezifischen Proteinen (z. B. Osteocalcin, Osteonectin und Osteopontin).^[171]

Das Kollagen ist für die Zugfestigkeit des Knochens verantwortlich. Die hierarchische Struktur des Knochens lässt sich in verschiedene Organisationsstufen unterteilen, angefangen bei den Kollagenfibrillen und den inkorporierten Calciumphosphat-Kristalliten bis hin zur makroskopischen Gesamtstruktur.^[1] Histologisch gesehen besteht der Knochen aus einer dichten äußeren Schicht (*Corticalis* – kompakter Knochen bzw. kortikaler Knochen) und einem inneren porösen Bereich (*Spongiosa* – schwammartiger spongiöser Knochen), der mit Knochenmark gefüllt ist.^[34] Die *Spongiosa*, gekennzeichnet durch ihre Leichtbauweise, besteht aus einem hohen Hohlraumvolumen und aus Trabekeln (Knochenbälkchen), die sich entlang der Hauptbelastungsrichtungen (Trajektorien) ausrichten.^[171] Der Umbau der Trabekel unter dem Einfluss von Belastung wird durch das Wolffsche Transformationsgesetz beschrieben, welches die Änderung der inneren Struktur unter Beanspruchung beschreibt und schon seit 1892 bekannt ist.^[34] Nach außen hin wird der Knochen durch die Knochenhaut (*Periosteum*) abgeschirmt.^[34] Da jede Masse ein

Trägheitsmoment aufweist, kann der Energieverbrauch des motorischen Systems bei Beschleunigungsvorgängen durch die optimierte Leichtbauweise somit niedriger ausfallen.^[171] Die *Corticalis* besteht als Grundbaueinheit aus den Osteonen (Havers-System), dabei handelt es sich um konzentrisch angeordnete Lamellen, die einen zentralen Kanal (Havers-Kanal) umgeben.^[3] Diese entlang der Längsachse ausgerichteten Zylinder (gesamtes Osteon) sind zusammen mit äußeren und inneren Generallamellen sowie Schaltlamellen strukturell organisiert und bilden die Substanz des kompakten Knochens.^[3]

Im Knochengewebe befinden sich drei unterschiedliche Knochenzellen, die Osteoblasten, die Osteozyten und die Osteoklasten.^[171] Osteoblasten sind für Knochen aufbauende Prozesse verantwortlich und synthetisieren die Knochenmatrix (Osteoid).^[3] Durch Einlagerung von Calciumphosphat (Mineralisierung) in die Knochenmatrix werden die Osteoblasten eingeschlossen und differenzieren im weiteren Verlauf zu Osteozyten.^[3] Die Osteozyten befinden sich in Lakunen und stehen mit benachbarten Zellen über *Gap Junctions* untereinander in Kontakt, was den Stoff- und Signaltransport ermöglicht.^[3] Möglicherweise sind Osteozyten an der Erkennung von Formänderungen des Knochens bei mechanischen Belastungen beteiligt und könnten somit die Regulierung des Knochenabbaus und Knochenaufbaus maßgeblich beeinflussen.^[172] Für den Knochenabbau sind die Osteoklasten verantwortlich.^[174] Im dauernden Knochenumbau erfüllen sie durch die Knochenresorption eine wichtige Aufgabe, indem sie den Knochenaufbau der Osteoblasten begrenzen.^[171] Diese Zellen erzeugen eine Resorptionslakune, in der durch Sezernierung von H^+ -Ionen ein saures Milieu zur Auflösung der mineralischen Kristalle geschaffen wird.^[171] Zur Aufspaltung von Matrixproteinen werden Enzyme im Resorptionsbereich freigesetzt.^[171] Es wird auf die zwei unterschiedlichen Arten der Knochenentstehung (Ossifikation) hingewiesen, die desmale und die chondrale Ossifikation, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.^[172] Das dynamische Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau ist charakteristisch für Knochengewebe und wird als *Remodeling* bezeichnet, bis heute ist aber der Mechanismus der Knochenbildung nicht vollständig verstanden.^[34]

Beim Bruch von Knochen entstehen Frakturen, die aufgrund der starken Durchblutung des Gewebes im Verlauf der Frakturheilung zu einer Wiederherstellung der Funktion und knöchernen Anatomie führen.^[172]

2.2. Biomaterialien

2.2.1. Knochenersatzmaterialien

Im Allgemeinen ersetzen Biomaterialien im Körper unterschiedlichste Körperfunktionen, die in ihrer Funktion beeinträchtigt sind bzw. verloren gegangen sind.^[34] Als Materialien kommen beispielsweise Metalle, Keramiken oder Polymere infrage. Bei kleineren Knochenfrakturen kommt es im Normalfall zu einer vollständigen Wiederherstellung des knöchernen Systems. Ab einer gewissen Größe besteht das Risiko, dass Bindegewebe in den Defekt einwächst und somit eine exakte Wiederherstellung des Knochens verhindert wird.^[34] In diesen Fällen ist es ratsam, Knochenersatzmaterialien in den Defekt einzubringen. Neben Frakturen durch Verletzungen können auch Krankheiten, Tumore und chirurgische Probleme zu knöchernen Defekten des Skeletts führen.^[5] Biomaterialien können dabei als kurzfristige, permanente oder auch als bioresorbierbare Systeme zur adäquaten Versorgung genutzt werden.^[11] Für temporäre Anwendungen eignen sich bioresorbierbare Systeme auf Polymerbasis, die im Idealfall in ihrer Degradationsgeschwindigkeit mit der Geschwindigkeit der Regeneration des entsprechenden Gewebes übereinstimmen. Der Einsatz von Biomaterialien ist seit der Antike für Wundverschlüsse, Zahnfüllungen, urologische Katheter und Prothesen bekannt.^[49] Nach der Definition der *European Society for Biomaterials* von 1991 wird ein Biomaterial wie folgt definiert: „*A biomaterial is any material intended to interact with biological systems to evaluate, treat, augment or replace any tissue, organ or function in the body.*“^[49] Manche Autoren gehen weiter und beziehen Biomaterialien in den aktuellen Kontext der Forschung mit ein, wie beispielsweise WILLIAMS: „*A biomaterial is a substance that has been engineered to take a form which, alone or as part of a complex system, is used to direct, by control of interactions with components of living systems, the course of any therapeutic or diagnostic procedure, in human or veterinary medicine.*“^[175] Im Bereich der Knochenersatzmaterialien lassen sich unterschiedliche Materialgruppen klassifizieren: Die organisch-biologischen Materialien, die organisch-synthetischen, die anorganisch-biologischen, die anorganisch-synthetischen sowie Kompositmaterialien.^[7] Autogenes oder autologes Knochenersatzmaterial bezeichnet patienteneigenen Knochen, der an einer Stelle des Körpers entnommen und an anderer Stelle wieder implantiert wird.^[7] Die Transplantation von autologem Knochen gilt bis heute als Goldstandard, ist aber auch gewissen Limitationen unterworfen.^[9] Von allogenen oder homologen

Knochenersatz spricht man, wenn der Knochen von einem anderen Spender stammt.^[7] Ist der Knochen tierischen Ursprungs, so spricht man von xenogenem Knochenersatzmaterial.^[7] Bei diesen natürlichen Knochenersatzmaterialien können vor allem bei allogenen und xenogenen Transplantaten immunologische Probleme und Infektionsgefahren nicht ausgeschlossen werden, folglich bergen sie ein Restrisiko in sich. Als alloplastische Knochenersatzmaterialien werden synthetische Biomaterialien als auch physikalisch oder chemisch behandelte, allogene oder xenogene Gewebe bezeichnet.^[7] Dabei kann es sich beispielsweise um gesinterte Transplantate handeln, bei denen nach Abbrand der organischen Komponenten nur noch die spongiöse Struktur übrig bleibt.^[34]

2.2.2. Anforderungen an den modernen Knochenersatz und Biomaterialien

An die Entwicklung moderner, innovativer und synthetischer Knochenersatzmaterialien wird eine Vielzahl von Anforderungen gestellt, bei der Naturwissenschaftler, Werkstoffwissenschaftler, Ingenieure und Mediziner gleichermaßen gefordert sind. Grundsätzlich ist die Einsatzdauer des Implantates von entscheidender Bedeutung, da andere Ansprüche an temporäre Systeme als an dauerhafte Lösungen gestellt werden. Idealerweise sollten Knochenersatz- bzw. Biomaterialien ausreichend stabil sein und eine gute Biokompatibilität (Gewebeverträglichkeit) aufweisen^[34] sowie dem natürlichen Vorbild physikalisch und chemisch nahe kommen.^[172] Dabei sind drei synergetisch wirkende Eigenschaftsfelder für die Biokompatibilität verantwortlich, die mechanische, die chemische und die biologische Kompatibilität.^[34] Somit kann ein System immer nur einen Kompromiss darstellen, und die spezielle Anwendung für die es entwickelt wurde, entscheidet über dessen Güte.^[34] Des Weiteren ist es wichtig, dass Biomaterialien in den vorhandenen Defekt inkorporiert werden und kein Infektionsrisiko darstellen.^[176] Unter strukturellen Gesichtspunkten ist eine hohe Porosität bei guter mechanischer Stabilität wünschenswert, die das Einwachsen von Knochengewebe ermöglicht.^[34] Eine interkonnektierende Porosität, die das Einwachsen von Zellen und die Vaskularisierung der Matrix ermöglicht, wäre dafür ideal.^[9] Um das Einwachsen von Knochen zu erleichtern und aktiv zu fördern, wird ein osteokonduktiver Effekt (Leitschieneneneffekt) angestrebt.^[34] Hierbei spielen beispielsweise die Mikro- und Makroporosität des Knochenersatzmaterials eine Rolle, das Implantat selbst stellt dabei eine dreidimensionale, passive Leitschiene

dar.^[176] Darauf aufbauend spricht man von osteoinduktiven Eigenschaften, wenn dem Material die Fähigkeit verliehen wird, die Osteogenese aktiv zu induzieren. Dabei fördern im Material vorhandene Differenzierungsfaktoren die Knochenneubildung durch Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten.^[176] Besonders die *bone morphogenic proteins* (Knochenwachstumsfaktoren) rücken in den Fokus der klinischen Forschung und Anwendung. Unter dynamischen Aspekten sollte das natürliche *Remodeling* des Knochens mit der Degradation des Transplantates übereinstimmen, also Aufbaugeschwindigkeit des Knochens und Abbaugeschwindigkeit von bioresorbierbaren Implantaten ineinandergreifen. Im Idealfall wird das Material somit im zeitlichen Verlauf vollständig durch körpereigenen Knochen ersetzt.^[34] Nicht außer Acht zu lassen sind wirtschaftliche Aspekte, denn Knochenersatzmaterialien müssen akzeptable Kosten aufweisen und deren Rohstoffe sollten möglichst in unbegrenzbarer Form verfügbar sein.^[176] Auch Grenzflächen-Wechselwirkungen zwischen Gewebe und Implantat (Oberflächenchemie) spielen eine Rolle.^[177, 178]

Abbildung 1 zeigt Anwendungsbeispiele von Biomaterialien am Skelettsystem. Es wird ersichtlich, dass je nach Einsatzzweck unterschiedlichste Eigenschaften benötigt werden.

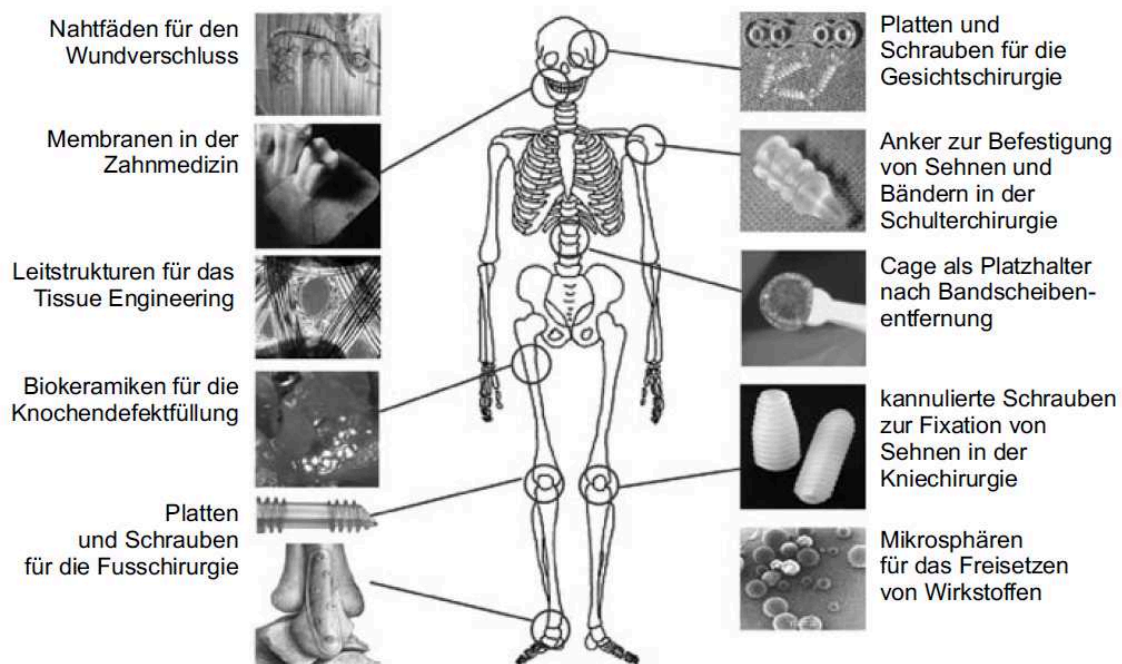


Abbildung 1: Die medizinische Anwendung von resorbierbaren Implantaten am humanen Körper (entnommen aus ^[172]).

2.2.3. Bioresorbierbare Polymere und Kompositmaterialien

Organische Polymere stellen eine wichtige Werkstoffklasse im Bereich der Biomaterialien dar und werden seit den 60er Jahren in der Medizin eingesetzt.^[34] Polymere besitzen eine hohe Molekülmasse und setzen sich aus mehreren gleichen (Homopolymer) bzw. gleichartigen (Copolymer) Monomereinheiten zusammen. Durch unterschiedliche Reaktionen lassen sich Polymere aus ihren Monomeren darstellen, hierzu zählen beispielsweise die Polyaddition, die Polykondensation, die Polymerisation sowie die Polyinsertion. Durch Veränderung des Polymerisationsgrades und Variation der Polymerketten (Querverzweigung und molekulare Struktur) können die physikalischen und chemischen Materialeigenschaften in beliebiger Weise modifiziert werden.^[34] Aufgrund ihrer guten Biokompatibilität und ihrem biologisch inerten Verhalten sind sie als Biomaterial heute fest etabliert. Die weitreichenden Möglichkeiten der Gestaltung polymerer Materialien eröffnen für die Zukunft viele neue Perspektiven.^[47] Im medizinischen Bereich werden beispielsweise Polyethylen (z. B. Hüftgelenkendoprothesen), Polymethylmethacrylat (PMMA, z. B. Knochenzement), Polysiloxane (z. B. künstliche Herzklappen) und Polytetrafluorethylen (PTFE, z. B. Nahtmaterial) als nicht resorbierbare Polymermaterialien verwendet.^[34] Als resorbierbare Osteosynthesematerialien werden hauptsächlich aliphatische Polyester wie Polyglycolid (PGA), Poly-*L*-Lactid (PLLA) und Poly-*D,L*-Lactid (PDLLA) verwendet. Eine übersichtliche Darstellung über funktionale Polyester für biomedizinische und pharmazeutische Anwendungen findet sich bei SEYEDNEJAD *et al.*^[53] Durch Kombination der genannten Homopolymere entstehen Copolymere, wie beispielsweise Poly(Glycolid-*co*-Lactid) (PGLA).^[34, 55] Die gezielte Variation der Comonomer-Verhältnisse führt so zu einer Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten, mit denen Einfluss auf die physikalischen Materialeigenschaften genommen werden kann. Dabei wird zwischen statistischen, alternierenden, Block- und Propf-Copolymeren unterschieden.^[34]

Poly lactide vereinen gute mechanische Eigenschaften mit guter Biokompatibilität und können im Körper zu ungiftigen Monomeren degradiert werden.^[34] Technisch erfolgt die Darstellung von Polylactid durch ringöffnende Polymerisation mit Zinnkatalysatoren sowie metallfreien Katalysatoren.^[179] Eine gute Übersicht über die verwendeten Katalysatoren zur Synthese von Polylactid findet sich bei GUPTA *et al.*^[180] Abbildung 2 zeigt schematisch, wie aus dem Dimer der Milchsäure das

Polymer Polylactid entsteht. Hierbei ist zu beachten, dass das Monomer der Milchsäure chiral ist und das zyklische Dimer der Milchsäure in drei stereoisomeren Formen vorkommt. Milchsäure selbst ist beispielsweise durch Fermentation zugänglich.^[181]

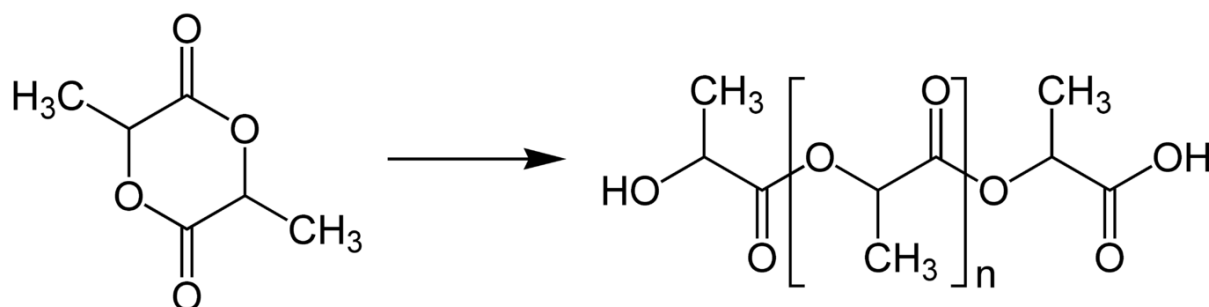


Abbildung 2: Aus dem zyklischen Dimer der Milchsäure entsteht durch ringöffnende Polymerisation Polylactid.

Hieraus resultieren die beiden unterschiedlichen Polylactide, Poly-*D*-Lactid (PDLA) und Poly-*L*-Lactid (PLLA) sowie beim Einsatz einer racemischen Mischung aus *D*- und *L*-Milchsäure das Polymer Poly-*D,L*-Lactid (PDLLA).^[34] Abbildung 3 zeigt den strukturellen Aufbau des Polymers Polylactid, einmal in (*R*)- und einmal in (*S*)-Konfiguration.

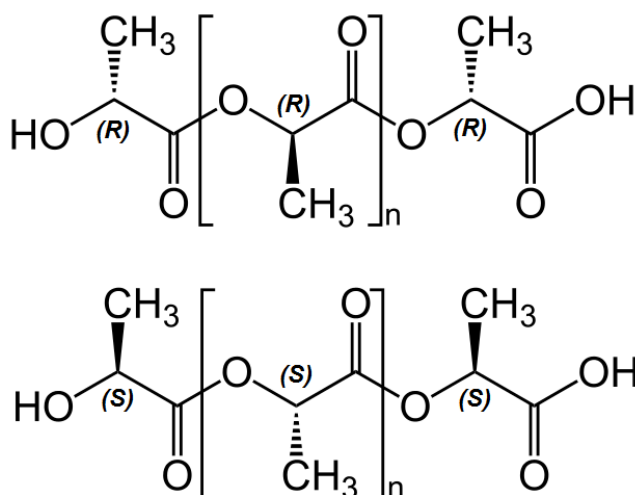


Abbildung 3: Polylactid in (*R*)- und (*S*)-Konfiguration der Milchsäure.

Bei Polymeren kann man die isotaktische und ataktische Anordnung der stereogenen Zentren und damit die Anordnung der Seitenketten im Polymer-Rückgrat unterscheiden. Bei einer isotaktischen Anordnung sind alle Methylgruppen (z. B. beim Polylactid) regelmäßig angeordnet (in eine Richtung zeigend) und im ataktischen Fall unregelmäßig angeordnet. Das erklärt das vollständig amorphe Verhalten von PDLLA (ataktisch) und den hohen Kristallinitätsgrad von PLLA (isotaktisch). PDLLA ist eher weich und leicht degradierbar, wohingegen PLLA sehr hart ist und sehr langsam degradiert.^[34]

Die Degradierbarkeit von Polylactid erklärt sich durch die hydrolytische Spaltung der Bindungen im Polymer-Rückgrat. Die Esterhydrolyse kann durch Säure und Base katalytisch beschleunigt werden.^[182] Der pH-Wert hat somit großen Einfluss auf das Degradationsverhalten *in vivo* und *in vitro*. Die Degradation ist dabei nicht auf die Oberfläche des Implantates beschränkt, sondern findet in der gesamten *bulk*-Phase des Materials statt.^[49] Die Diffusionsgeschwindigkeit von Wasser in das Material ist größer als die Degradationsgeschwindigkeit des Polymers.^[49] Die bei der Degradation freigesetzten Monomere sind physiologisch unbedenklich, weisen aber ein acidisches Verhalten auf. Wenn diese nicht schnell genug vom Organismus abgeführt werden oder sich bei der Degradation im Implantatinneren akkumulieren, autokatalysieren sie die weitere Degradation. Hieraus können Stabilitätsgradienten im Material entstehen sowie lokale Knochenauflösung (Osteolyse)^[34] und inflammatorische Gewebereaktionen resultieren.

Um dem Problem der sauren Degradationsprodukte vorzubeugen, können dem Polymer basische Puffersubstanzen zugesetzt werden. Hierzu eignen sich besonders Calciumphosphat und Calciumcarbonat, die beide eine gute Biokompatibilität aufweisen und im Körper selbst vorkommen. Die als Kompositmaterialien bezeichneten Materialien sollen den pH-Wert bei der Degradation stabilisieren und einen gleichmäßigen Abbau des Implantates ermöglichen. Eine gute Übersicht über unterschiedliche Kompositkonzepte und deren Einfluss auf die pH-Stabilität findet sich in der Dissertation von SCHILLER.^[57] Basische Füllstoffe können auch dazu beitragen, mechanische und physikalische Eigenschaften des Materials zu modifizieren und zu optimieren. In der Arbeitsgruppe von Prof. MATTHIAS EPPEL wurden im Verlauf der letzten Jahre zahlreiche Versuche zur Darstellung und Modifizierung von Kompositmaterialien unternommen, beispielsweise die Entwicklung von Systemen auf Basis von Polyglycolid, Polylactid,

Carbonat-ACP und Calciumphosphat. Auf die mechanischen Verfahrenstechniken zur Darstellung wird in späteren Kapiteln eingegangen.

2.2.4. Porosität, poröse Materialien und Porogene

Im Gegensatz zu soliden Festkörpern können in natürlichen und in synthetisch erzeugten Materialien Hohlräume (Poren) vorkommen. Wird die Volumenphase des Materials betrachtet, so wird diese häufig nicht komplett durch das eigene Material ausgefüllt. Durch eingeschlossene Luft bilden sich Poren bzw. dreidimensionale Hohlraumstrukturen, das Material ist somit porös. In der Natur vorkommende poröse Systeme sind beispielsweise Gesteine, die in ihrem Inneren inkorporierte Gaseinschlüsse aufweisen. Auch die genannte *Spongiosa* des Knochens hat eine poröse Struktur.^[3] Porosität ist definiert als das Verhältnis des Hohlraumvolumens (V_H) zum Gesamtvolumen (V) des Materials bzw. als eins minus dem Verhältnis aus Rohdichte (ρ) und Reindichte (ρ_0) des Materials und lässt sich mathematisch wie folgt ausdrücken:

$$\Phi = 1 - \frac{\rho}{\rho_0} \quad (1)$$

Die Porosität wird häufig in Prozent angegeben. Multipliziert man die Gleichung (1) mit 100 %, so erhält man die Porosität in Prozent. Anhand der Porosität alleine lassen sich noch keine Angaben über die Porengröße vornehmen, hierzu bedarf es weiterer analytischer Verfahren. Auf struktureller Ebene lassen sich zwei Grenzfälle unterscheiden, die geschlossene Porosität und eine offene bzw. interkonnektierende Porosität. Bei einer geschlossenen Porosität stehen die einzelnen Poren untereinander nicht in Kontakt und bilden in sich geschlossene Kavitäten, im Gegensatz zu einer interkonnektierenden Porosität. Porosität lässt sich nach der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) auch anhand ihrer Porengröße klassifizieren. Es wird unterschieden zwischen mikroporös (< 2 nm), mesoporös (2 - 50 nm) und makroporös (> 50 nm).

Poröse Materialien sind in unterschiedlichsten Forschungsrichtungen und Anwendungen von entscheidender Bedeutung,^[183] beispielsweise im werkstoffwissenschaftlichen Kontext. Da der spongiöse Knochen von Natur aus auch porös ist, drängt sich die Bedeutung der Porosität für die Entwicklung von

Knochenersatzmaterialien auf. Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, ist es wünschenswert, dass Knochenzellen in das Implantat einwachsen können und die Matrix im weiteren Verlauf vaskularisiert werden kann. Somit ist neben der richtigen Materialwahl auch auf verfahrenstechnischer Seite der Anspruch nach einer adäquaten Rekonstruktion der physiologisch knöchernen Anatomie vorhanden, der Idealfall ist ein interkonnektierendes System. Die verfahrenstechnische Umsetzung kann entweder durch physikalisches Schäumen amorpher Polymere mit überkritischem Kohlenstoffdioxid erfolgen (s. Kap. 3.13) oder durch das Porogenverfahren. Letzteres kann mit diversen Press- oder dem Schäumungsverfahren kombiniert werden. Die vorliegende Arbeit berücksichtigt nur das Schäumungsverfahren. Nicht immer gelingt die Realisierung offenporiger Systeme, da erst ab einem gewissen Porositätsgrad interkonnektierende Systeme durch den Schäumvorgang entstehen. Die Porosität lässt sich nur bis zu einem speziellen Grad steigern, da die Stabilität und Homogenität des Materials ab einem gewissen Punkt deutlich absinken. Durch Degradation des Implantates können allerdings im zeitlichen Verlauf aus geschlossenporigen Systemen offenporige Systeme entstehen, indem die dünnen Porenwände degradiert werden. Der Schäumungsvorgang führt unter idealen Bedingungen zu einer Porosität von 50 % bei guter Stabilität und Homogenität des Materials. Höhere Porositätsgrade können durch den Einsatz von Porogenen (Opfertemplate) erhalten werden. Dabei wird dem Biomaterial ein Feststoff (Porogen) zugesetzt, welcher im späteren Verlauf wieder aus dem Material entfernt wird. Durch die Partikelgröße und Gestalt des Porogens werden der Porendurchmesser und die Morphologie bestimmt sowie durch den Volumenanteil des Porogens der Porositätsgrad festgelegt,^[57] auch in Kombination mit Keramiken können Porogene eingesetzt werden.^[85] Im Idealfall wird das Porogen mit einem Lösemittel gelöst, welches das Biomaterial selbst nicht angreift, oder es wird mittels hoher Temperatur aus dem Material eliminiert. Systeme aus Natriumchlorid- oder Saccharose-Kristallen haben sich dabei etabliert.^[81-83, 85, 86] Auch der Einsatz von Polyethylenoxid^[87] und Polyvinylalkohol-Fasern^[184] als Porogen wird in der Literatur beschrieben. Bei hinreichend hoher Porogenkonzentration berühren sich die einzelnen Kristalle untereinander und können so ein interkonnektierendes Porensystem nach ihrer Entfernung bilden. Die daraus resultierende geringere mechanische Stabilität ist bei sogenannten *scaffolds* im *tissue engineering* weniger von Bedeutung als im Bereich der

Knochenersatzmaterialien. Deshalb finden sich in diesem Bereich auch mehr potentielle Anwendungen des Porogenverfahrens.^[56, 185] Eine gute Übersicht über die Herstellung poröser Substrate und über den Einsatz unterschiedlichster Porogene findet sich bei CHEVALIER *et al.*^[84]

2.2.5. Osteomyelitis und kontrollierte Wirkstofffreisetzung

Neben den materiellen Aspekten und den speziellen Anforderungen an Implantatmaterialien spielen auch Infektionsrisiken im Kontakt mit biologischem Gewebe eine Rolle. Da durch die Implantation Fremdkörper in den Organismus eingebracht werden, können Entzündungen des Knochens entstehen (Osteomyelitis bzw. Osteitis). Diese Infektion kann auch partiell am Knochen auftreten, betroffen sein können die *Corticalis*, das *Periost* oder das Knochenmark. Auch chronische Verlaufsformen sind bekannt, die durch destruktive Entzündungsprozesse gekennzeichnet sind.^[186] Die Osteomyelitis bzw. Osteitis ist eine schwerwiegende und ernsthafte Komplikation, die der chirurgischen und medikamentösen Intervention bedarf.^[187-194] Dabei kommen auch offene Frakturen, bedingt durch Unfälle, als Auslöser in Betracht. Häufig ist das Kugelbakterium vom Typ *Staphylococcus aureus* als Verursacher beteiligt.^[170]

Die Osteomyelitis bedarf der frühzeitigen Diagnostik und Behandlung, um chronische Verläufe zu verhindern und eine Ausbreitung der Infektion in umliegendes Gewebe zu vermeiden. Den Segmentresektionen von infiziertem Knochengewebe schließt sich eine medikamentöse Behandlung an, diese kann auch prophylaktisch bei der Implantation von Knochenersatzmaterialien durchgeführt werden. Die medikamentöse Therapie besteht hauptsächlich aus diversen Antibiotika, die sowohl systemisch als auch lokal appliziert werden können. Systemische Gaben haben den Nachteil, dass die Wirkstoffkonzentration lokal zu niedrig ausfällt und somit eine effektive Behandlung der Entzündung unterbleibt.^[34] Manche oral applizierte Wirkstoffe können ihre biologische Wirksamkeit bei der Passage des Magen-Darm-Traktes einbüßen.^[34] Die lokale Wirkstoffapplikation durch Trägermaterialien erlaubt eine effektivere Konzentration des entsprechenden Antibiotikums und reduziert gleichzeitig die systemische Toxizität.

Im Bereich der Knochenzemente wird zurzeit die Anwendung von Silber in nanopartikulärer Form als antimikrobielles Agens diskutiert.^[195, 196] Auch für diverse weitere Anwendungen im Bereich der Biomaterialien und Biomedizin ist

nanopartikuläres Silber im Fokus der Diskussion.^[197, 198] Allerdings sind die toxikologischen Eigenschaften und die Wirkungen auf Knochenzellen von Silber Nanopartikeln noch Gegenstand der aktuellen Forschung.^[199-201] Auch die Stabilität und Derivatisierung derlei Partikel, die die Vorhersehbarkeit chemischer, physikalischer und toxikologischer Eigenschaften erschweren kann, ist zu beachten.^[202, 203]

Gentamycin ist ein Breitbandantibiotikum und hat sich in der Behandlung bakterieller Infektionen und in der Prophylaxe etabliert.^[23] Chemisch betrachtet ist Gentamycin ein Aminoglycosid mit guter Wasserlöslichkeit und damit für die physiologische Anwendung prädestiniert. Der Wirkmechanismus von Gentamycin beruht auf der Inhibition der 30s-Untereinheiten der Ribosomen in der Bakterienzelle.^[204] Gentamycin gelangt zunächst über das bakterielle Transportsystem in die Bakterienzelle und initiiert dort die Bildung falscher tRNA-Aminosäurekomplexe.^[204] Es kommt zu Integritätsstörungen der Zellmembran, indem sich Risse in der äußeren Membran der Bakterienzelle bilden.^[205] Abbildung 4 zeigt die chemische Struktur von Gentamycin, es kommt als Gemisch in unterschiedlichen Formen vor. Die Reste (R^1 - R^3) sind entweder durch Methylgruppen oder Wasserstoffatome abgesättigt.

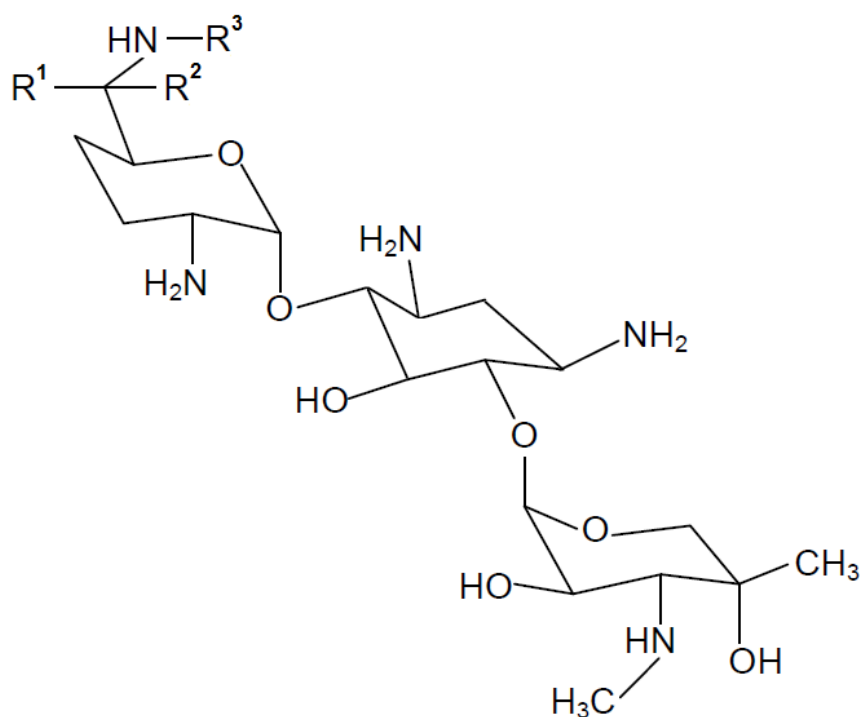


Abbildung 4: Die chemische Struktur des Aminoglycosids Gentamycin.

Von FASSBENDER *et al.* konnte gezeigt werden, dass Gentamycin keinen negativen Einfluss auf die langfristige Knochenheilung im Tiermodell hat.^[206] Wie bei jedem Medikament kann es aber auch bei Gentamycin zu Nebenwirkungen im Organismus kommen, die Applikation ist beispielsweise mit einer potentiellen Nephrotoxizität assoziiert.^[207]

Die langsame Diffusion von Wirkstoffen aus Knochenzementen, Wirkstoffträgern oder Knochenersatzmaterialien wird als kontrollierte Wirkstofffreisetzung bezeichnet. Sie hat als Ziel, eine zeitlich und örtlich besser definierte Wirkstoffapplikation zu ermöglichen.^[34] Die Freisetzung des Wirkstoffs kann entweder durch Diffusion aus dem Biomaterial erfolgen oder im zeitlichen Verlauf durch Degradationsprozesse des Materials an die Umgebung geschehen.^[34] Schon in den 1970er Jahren wurde Gentamycin einem Knochenzement aus Polymethylmethacrylat (Handelsname Palacos®) zugesetzt. Von WAHLIG *et al.* wurde beispielsweise die Freisetzungskinetik von Gentamycin aus Polymethylmethacrylat untersucht.^[23] Dabei sind auch Kugelketten aus Polymethylmethacrylat (Handelsname Septopal®) im Gebrauch. Diese Wirkstoffträger können zur Osteomyelitisbehandlung direkt in den Knochenraum eingebracht und nach erfolgter Freisetzung des Antibiotikums wieder explantiert werden.^[34] Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau einer Kugelkette.

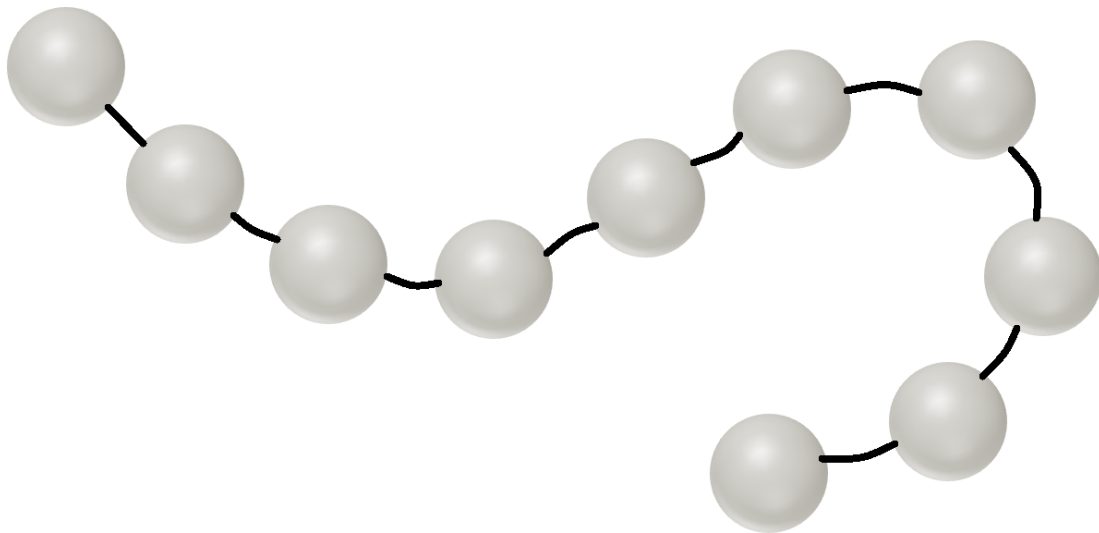


Abbildung 5: Eigene schematische Darstellung einer Kugelkette als Wirkstoffträger (Septopal®).

In der vorliegenden Arbeit wird Gentamycin als Modellwirkstoff zur Infektions-Prophylaxe in das Kompositmaterial eingebracht und die Freisetzungskinetik aus dem geschäumten Material *in vitro* untersucht. Aminoglykoside wie Gentamycin lassen sich nach Derivatisierung mittels UV/Vis-Spektroskopie quantifizieren.^[208]

2.3. Grundlagen der Kolloidchemie

2.3.1. Eigenschaften kolloidaler Systeme

Der Begriff »Kolloid« wurde erstmals 1861 von GRAHAM genutzt.^[209] Ursprünglich war die leimartige und trübe Beschaffenheit der Kolloide charakteristisch. 1931 wurden Kolloide von HEDGES noch als „[...] rätselhaft und unkontrollierbar [...]“ beschrieben.^[90] Kolloidale Systeme sind Dispersionen einer fein verteilten dispersen Phase in einem anderen Stoff (Dispersionsmedium). Dabei können die dispergierten Teilchen eine Größe zwischen 1 nm und 1000 nm (mindestens eine Dimension) nach der Definition der IUPAC von 1971 aufweisen.^[209] Andere Definitionen geben eine Größe zwischen 1 nm und 500 nm an.^[210] Oft handelt es sich aber um suspendierte Nanopartikel (Größe < 100 nm). Da sie physikalisch nicht „echt“ gelöst sind und damit nicht molekulardispers verteilt vorliegen, zeigen kolloidale Lösungen den Tyndall-Effekt. Die Größenordnung der Teilchen liegt im Bereich der Wellenlängen des sichtbaren Lichts oder sogar darunter.^[211] Da die Teilchen so klein sind, sedimentieren sie nicht unter dem Einfluss der Schwerkraft, sie weisen aber dennoch typische Grenzflächenerscheinungen diskreter Partikel auf. Um sie zu betrachten, bedarf es elektronenmikroskopischer Verfahren, da sie für herkömmliche lichtmikroskopische Untersuchungen – aufgrund ihrer Größe – nicht zugänglich sind. Durch dieses Verfahren lassen sich Größe und Morphologie der Partikel exakt bestimmen.

Das Dispersionsmedium und die disperse Phase können bei kolloidalen Systemen im flüssigen, im festen und im gasförmigen Aggregatzustand vorkommen.

Tabelle 1: Klassifizierung kolloidaler Systeme (entnommen aus ^[209]).

Bezeichnung	Kolloid	Dispersionsmittel	Beispiele
Feste Emulsionen	Flüssig	Fest	Opal, Perlen
Emulsionen	Flüssig	Flüssig	Milch, Mayonnaise
Flüssige Aerosole	Flüssig	Gas	Nebel, Haarspray
Feste Sole	Fest	Fest	Blaues Steinsalz
Suspensionen	Fest	Flüssig	Kolloide in Gewässern
Feste Aerosole	Fest	Gas	Staub, Rauch
Feste Schäume	Gas	Fest	Styropor, Bimsstein
Flüssige Schäume	Gas	Flüssig	Seifenschaum

Je nach Kombination lassen sich unterschiedliche Typen kolloidaler Systeme definieren (vgl. Tabelle 1). Neben der Größe und dem Aggregatzustand werden nach STAUDINGER Kolloide in Dispersionskolloide, Assoziationskolloide und Molekülkolloide unterteilt.^[209] Dispersionskolloide entstehen beispielsweise durch Zerkleinerung fester Stoffe, die in einem Dispersionsmittel fein verteilt vorliegen (hydrophobe Kolloide). Diese Systeme sind thermodynamisch instabil und neigen zur Aggregation bzw. Agglomeration, es bedarf daher einer elektrostatischen oder sterischen Stabilisierung (kinetische Hemmung der Koagulation) zur Wahrung ihres kolloidalen Charakters.^[209] Bei Molekülkolloiden erreichen die Moleküle selbst die Größe kolloidaler Teilchen und stellen ein thermodynamisches, hydrophiles und stabiles System dar. Hierzu zählen beispielsweise Makromoleküle wie Polysaccharide. Assoziationskolloide bzw. Mizellkolloide entstehen in Abhängigkeit ihrer Konzentration und bilden sich aus molekular gelösten Substanzen. Sie weisen einen hydrophilen Charakter auf und sind thermodynamisch stabil, hierzu gehören grenzflächenaktive Stoffe wie Seifen oder Tenside.^[209]

Aufgrund der Größenordnung kolloidaler Systeme steigt das Verhältnis von Oberfläche zum Volumen stark an und damit die spezifische Oberfläche derlei Systeme. Die Anzahl grenzflächennaher Atome gegenüber Atomen in der Volumenphase ist stark erhöht. Grenzflächennahe Atome sind aufgrund ihrer Energie und Valenzabsättigung physikalisch von Atomen in der Volumenphase zu unterscheiden. Deshalb sind kolloidale Systeme besonders durch Ober- und Grenzflächenphänomene geprägt.

Grundsätzlich lassen sich kolloidale Systeme bzw. nanoskalige Systeme auf zwei unterschiedliche Arten generieren. Aufbauende Synthesen (*bottom-up approach*) generieren Partikel ausgehend von einzelnen Atomen bis hin zu einer makroskopischen festen Phase. Hierbei spielen die Keimbildung, die anschließende Termination des Wachstums und die kinetische Stabilisierung der entstandenen Partikel eine große Rolle.^[89] Beispiele für aufbauende Synthesen sind die chemische Gasphasenabscheidung (CVD) oder nasschemische Verfahren. Abbauende Prozesse (*top-down approach*) gehen von einer makroskopischen festen Phase aus, die durch mechanische Einwirkung bis auf nanoskalige Dimensionen bzw. kolloidale Dimensionen zerkleinert wird, dies kann beispielsweise durch elektrisches Zerstäuben von Metallen erfolgen.^[211] Generell gewinnt die Kontrolle der Teilchengröße bei der Herstellung nanopartikulärer Systeme sowohl für die

Grundlagenforschung als auch für technische Anwendungen zunehmend an Bedeutung.^[90]

2.3.2. DLVO-Theorie und die Stabilisierung von Kolloiden

Die DLVO-Theorie, benannt nach DERJAGUIN, LANDAU, VERWEY, OVERBEEK, beschreibt die kolloidale Stabilität von dispersen Systemen,^[90, 212] hierbei steht die Wechselwirkungsenergie zwischen einzelnen Kolloiden im Fokus. Die Stabilität einer kolloid-dispersen Phase wird durch zwei Arten von Wechselwirkungen geprägt. Charakteristisch ist die Addition der repulsiven elektrostatischen Wechselwirkung und der attraktiven Van-der-Waals-Wechselwirkung (fluktuierende Dipol-Wechselwirkung). Abbildung 6 zeigt den Potentialverlauf der unterschiedlichen Wechselwirkungen für zwei Teilchen in Abhängigkeit ihres Abstandes zueinander.

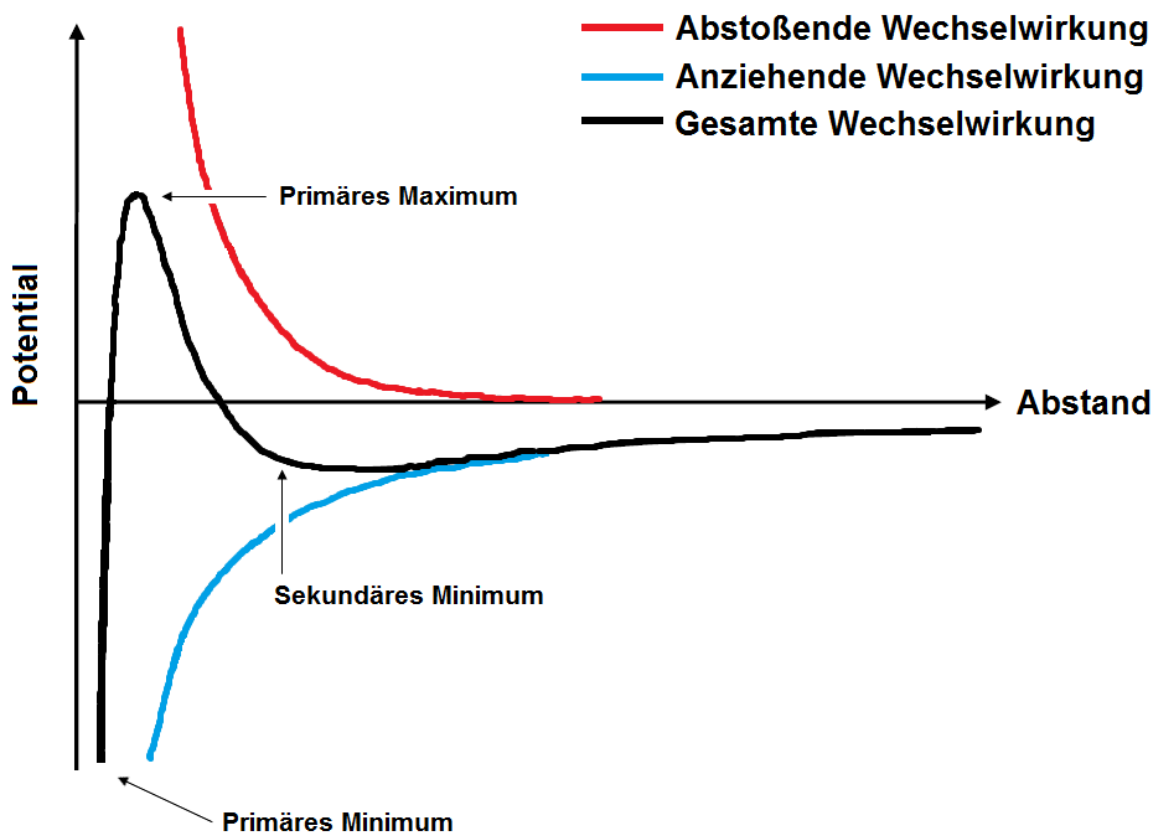


Abbildung 6: Potentialverlauf der abstoßenden, der anziehenden und der gesamten Wechselwirkung zweier Kolloide in Abhängigkeit ihres Abstandes zueinander (in Anlehnung an ^[212]).

Die attraktive Van-der-Waals-Wechselwirkung ist abhängig vom Abstand der Teilchen zueinander, und sie verhält sich umgekehrt proportional zum Quadrat des Partikelabstandes (in erster Näherung).^[209] Zwischen zwei einzelnen Teilchen nimmt die Anziehung hingegen umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstandes ab. Die attraktive Gesamtwechselwirkung hat somit eine größere Reichweite als die Wechselwirkung zwischen zwei Partikeln.^[210] Für die repulsive elektrostatische Wechselwirkung ist im Wesentlichen das Oberflächenpotential verantwortlich. Dieses kann mit der Gouy-Chapman-Theorie berechnet werden, indem die Oberflächenladung, die Elektrolytkonzentration der Lösung und der Partikelabstand herangezogen wird.^[209] Die Stabilität einer kolloid-dispersen Phase ist abhängig von der Dimension des Potentials am primären Maximum. Je größer das Potential ist, desto stabiler ist die Dispersion. Erst wenn diese Energiebarriere überwunden ist, beginnt das System irreversibel zu koagulieren und strebt auf das primäre Minimum hin. Dort bilden sich irreversible Aggregate, die sich durch Rekristallisationseffekte zu einer makroskopisch festen Phase entwickeln können. Zu einer reversiblen Agglomeration kommt es bereits beim Abstand des sekundären Minimums („Flockung im sekundären Minimum“^[90]), von dort aus lässt sich das System aber durch Energieeintrag (Scherkräfte) wieder dispergieren.^[209] Nach der DLVO-Theorie sind demnach Dispersionen stabil, bei denen die repulsiven Kräfte die attraktiven Kräfte kompensieren.

Ein kolloid-disperses System kann durch entsprechende Stabilisierung kinetisch an der Koagulation gehindert werden. Die Kolloidstabilisierung in einem Dispersionsmedium kann auf unterschiedliche Arten realisiert werden: Man unterscheidet die sterische Stabilisierung, die elektrostatische Stabilisierung und eine Kombination der beiden erst genannten Stabilisierungen, die elektrosterische Stabilisierung.^[212] Wenn Polymere oder sterisch anspruchsvolle Moleküle auf der Partikeloberfläche adsorbieren, so kommt es zu einer entropischen bzw. sterischen Stabilisierung. Sobald die Polymerhüllen untereinander in Kontakt treten, stoßen sich die einzelnen Partikel durch die Raumauffüllung dieser Liganden ab, so wird die Agglomeration verhindert und wirkt den attraktiven Kohäsionskräften entgegen. Bei diesem Vorgang spielt die Konzentration des Polymers eine entscheidende Rolle. Bei der elektrostatischen Stabilisierung erfolgt die Abstoßung durch adsorbierte Oberflächenladungen (Coulomb-Abstoßung). Diese resultieren aus geladenen Molekülen oder Ionen, die durch Ausbildung einer gegenseitig geladenen

Ladungsschicht in der flüssigen Phase ergänzt werden (elektrische Doppelschicht). Wenn zur Stabilisierung sowohl Polymere als auch Oberflächenladungen beitragen, so spricht man von elektrosterischer Kolloidstabilisierung.^[212] Abbildung 7 zeigt die drei Möglichkeiten der genannten Kolloidstabilisierung.

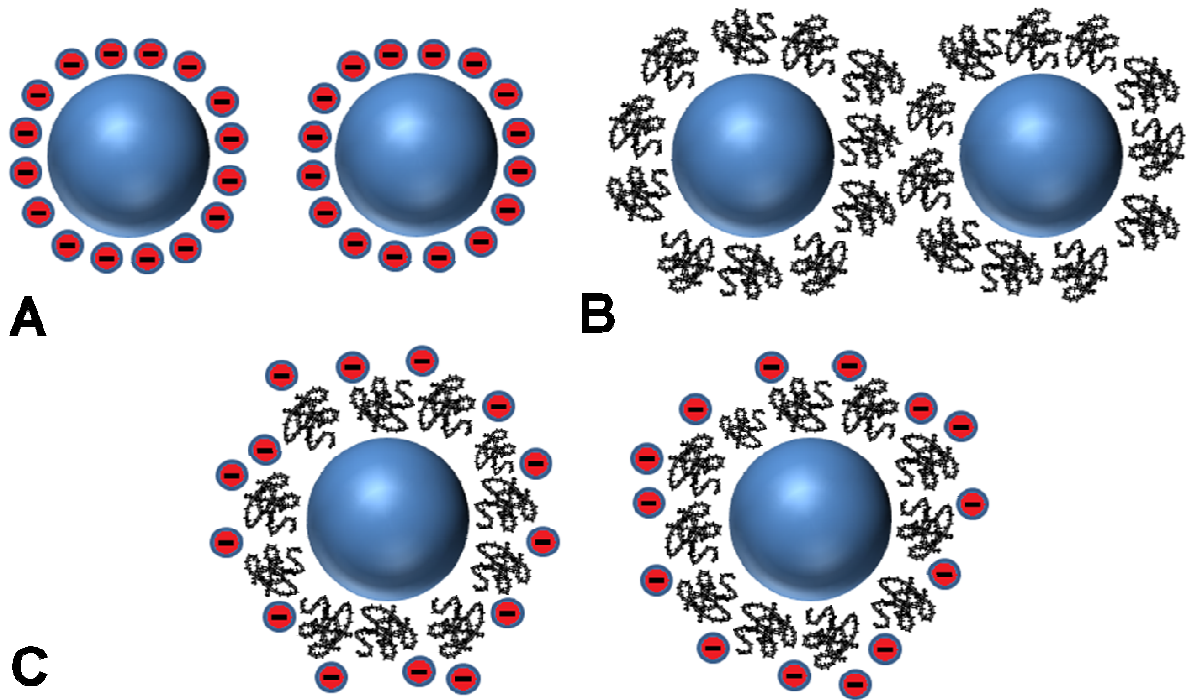


Abbildung 7: Möglichkeiten der Kolloidstabilisierung: A) elektrostatische Stabilisierung, B) sterische Stabilisierung und C) elektrosterische Stabilisierung (in Anlehnung an ^[212]).

2.3.3. Zetapotential

Durch die Adsorption von geladenen Spezies auf der Kolloidoberfläche entsteht eine Oberflächenladung auf dem Partikel. Die erste Schicht direkt auf der Oberfläche des Partikels ist eine feste Schicht, die auch Wassermoleküle beinhalten kann. Als Scherradius bezeichnet man den Radius dieser ersten festen Schicht.^[210] Der Scherradius hat großen Einfluss auf die Beweglichkeit der einzelnen Kolloidteilchen. Betrachtet man das elektrische Potential auf der Partikeloberfläche und im umgebenden Dispersionsmedium, so ergibt sich aus deren Relation das Zetapotential (ζ -Potential) bzw. das elektrokinetische Potential.^[210] Durch die Anlagerung von gegensinnig geladenen Ionen auf der ersten Ladungsschicht entsteht eine bewegliche, diffuse Ladungswolke um das Partikel.^[210] Beide

Ladungsschichten zusammen werden strukturell als elektrische Doppelschicht bezeichnet. 1879 wurde von HELMHOLTZ ein einfaches Modell einer starren elektrischen Doppelschicht vorgestellt, das später von GOUY und CHAPMAN zur Theorie der diffusen Doppelschicht weiterentwickelt wurde.^[213] Die elektrische Doppelschicht kann heute durch das Stern-Modell beschrieben werden, es kombiniert bzw. überlagert die starre Helmholtzsche Schicht und die diffuse Gouy-Chapmansche Schicht.^[213] Abbildung 8 zeigt den Potentialverlauf in Abhängigkeit vom Partikeloberflächen-Abstand. In der starren Sternschicht verläuft der Potentialabfall linear, während in der diffusen Schicht ein exponentieller Potentialabfall zu beobachten ist.^[212]

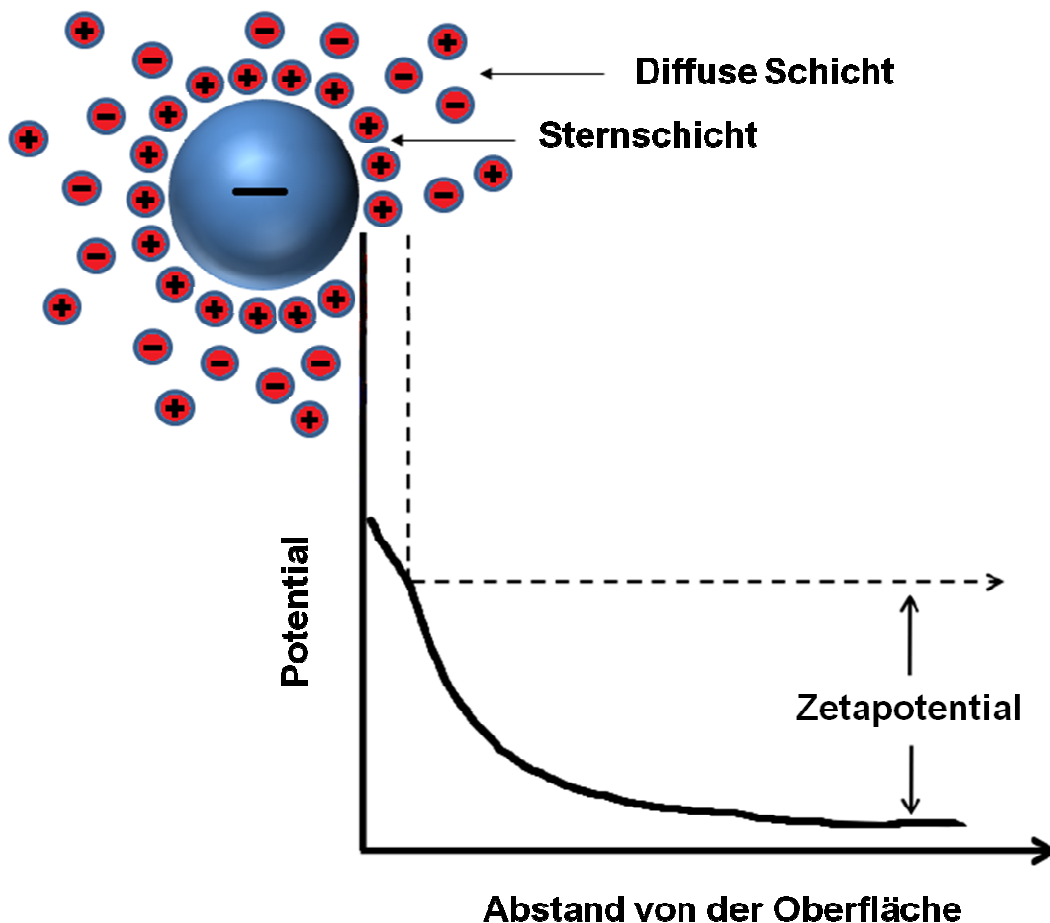


Abbildung 8: Die schematische Darstellung der elektrischen Doppelschicht und die daraus resultierenden Potentialverläufe in Abhängigkeit des Abstandes von der Partikeloberfläche (in Anlehnung an ^[212]).

Bei der Translation der einzelnen Partikel durch das Dispersionsmedium, beispielsweise beim Anlegen eines elektrischen Feldes, bewegen sich sowohl die starre Schicht als auch partiell die diffuse Schicht mit. Ein Teil der diffusen Schicht wird dabei abgeschert, wodurch eine Scherebene entsteht. Durch die Messung der Partikelgeschwindigkeit im elektrischen Feld kann das Zetapotential berechnet werden.^[90] Das Zetapotential kann als Kriterium für die elektrostatische Stabilität von Kolloiden herangezogen werden. Ist der Betrag des Zetapotentials größer als +30 mV bzw. kleiner als -30 mV, so werden Kolloide als elektrostatisch stabil betrachtet.^[214]

2.3.4. Alterung kolloid-disperser Systeme

Das Streben eines Systems nach dem thermodynamisch günstigsten Zustand wird bei kolloid-dispersen Systemen als Alterung bezeichnet. Durch Koagulation oder Flockung versucht das System, den thermodynamisch stabilen Zustand durch Reduktion der Grenzflächenenergie zu erreichen. Diese Phänomene setzen spontan ein, wenn es zu einer Abnahme der gesamten Gibbsenergie im System kommt.^[90]

Die Alterungsgeschwindigkeit von Kolloiden kann quantitativ beschrieben werden und hängt mit der Löslichkeit der makroskopischen Phase, der Temperatur, der Grenzflächenspannung, dem Radius der kolloidalen Teilchen und der Viskosität zusammen.^[212] Dieser Prozess des Zerfalls des kolloidalen Systems kann zur Separation der festen und der flüssigen Phase führen. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn in Wasser dispergierte Nanopartikel altern. Neben der Verminderung der Gesamtoberfläche spielen bei der Alterung gelartiger Kolloide auch Kondensations- und Kristallisationsvorgänge sowie Wasserabgabe eine Rolle.^[211] Theoretisch sollte in einem exakt monodispersen System keine Alterung zu beobachten sein. In der Realität kommt es jedoch selbst in monodispersen Systemen zu kleinsten Schwankungen der Partikelgröße und damit zu Alterungsprozessen.

Ein weiterer Grund für die thermodynamische Instabilität von kolloidalen Systemen ist die Ostwaldreifung. Hierbei handelt es sich um einen Reifeprozess kolloid-disperser Systeme, bei dem der Dampfdruck und die Löslichkeit kolloidaler Teilchen eine Rolle spielen. Zusammengefasst wird damit die Auflösung kleinerer Teilchen zugunsten der Bildung größerer Partikel beschrieben.^[90]

2.4. Siliciumdioxidnanopartikel

2.4.1. Eigenschaften von Siliciumdioxidnanopartikeln

Siliciumdioxid, ein harter und polymerer Festkörper, ist auf der Erde weit verbreitet und tritt in amorphen sowie kristallinen Formen auf.^[215] SiO_2 ist gegenüber Säuren inert und wird nur von Flusssäure angegriffen. Die Siliciumatome sind sp^3 -hybridisiert und strukturell mit vier Sauerstoffatomen tetraedrisch koordiniert. Die einzelnen SiO_4 -Tetraeder sind an den Ecken gemeinsam verknüpft und bilden die repetitive Grundeinheit des Festkörpers. Die Si-O-Bindung weist eine hohe Bindungsenergie und Polarität auf, die durch π -Bindungsanteile der freien p-Elektronenpaare des Sauerstoffs und leeren Orbitalen des Siliciums erklärt werden kann.^[215] Siliciumdioxid kommt in unterschiedlichen Modifikationen in der Natur vor, hierzu zählen Quarz, Tridymit und Cristobalit, die sich in ihrem strukturellen Aufbau der SiO_4 -Tetraeder unterscheiden. Unter Standardbedingungen ist dabei α -Quarz die thermodynamisch günstigste Modifikation.

Monodisperse, kolloidale Siliciumdioxidpartikel lassen sich beispielsweise nach der Methode von STÖBER synthetisieren.^[216] Bei diesem Prozess wird Tetraethylorthosilicat (TEOS) zuerst hydrolysiert und durch anschließende Kondensationsreaktionen zum gewünschten Produkt umgesetzt. Durch Variation der Volumenverhältnisse und Reaktionsbedingungen kann die Partikelgröße kontrolliert werden. Der Einfluss der Tetraethylorthosilicat- und Ammoniak-Konzentration auf die Partikelgröße wurde beispielsweise von IBRAHIM *et al.* untersucht.^[217] Stabile Dispersionen von Nanopartikeln werden als Sol bezeichnet und sind im Fall von Siliciumdioxid kommerziell erhältlich.

Die Oberflächenchemie von amorphen Siliciumdioxidnanopartikeln ist besonders durch das Vorkommen von Silanolgruppen geprägt. Diese haben entscheidenden Einfluss auf die Oberflächeneigenschaften des Systems und bilden in Abhängigkeit ihrer Konzentration einen eher hydrophilen bzw. hydrophoben Charakter. Je größer die Anzahl von Hydroxyl-Gruppen auf der Oberfläche ist, desto hydrophiler ist die Oberfläche.^[218] Die Hydroxylgruppen sättigen die freien Valenzen der Siliciumatome an der Grenzfläche des Festkörpers ab. Neben Silanolgruppen finden sich auch hydrophobe Siloxangruppen auf der Oberfläche. Da die Oberflächenchemie von Siliciumdioxid vergleichsweise komplex ist, kann an dieser Stelle nur ein kurzer Überblick gegeben werden. Für detailliertere Informationen sei auf weiterführende

Literatur verwiesen.^[219, 220] Abbildung 9 zeigt die unterschiedlichen Typen von Silanol- bzw. Siloxangruppen.

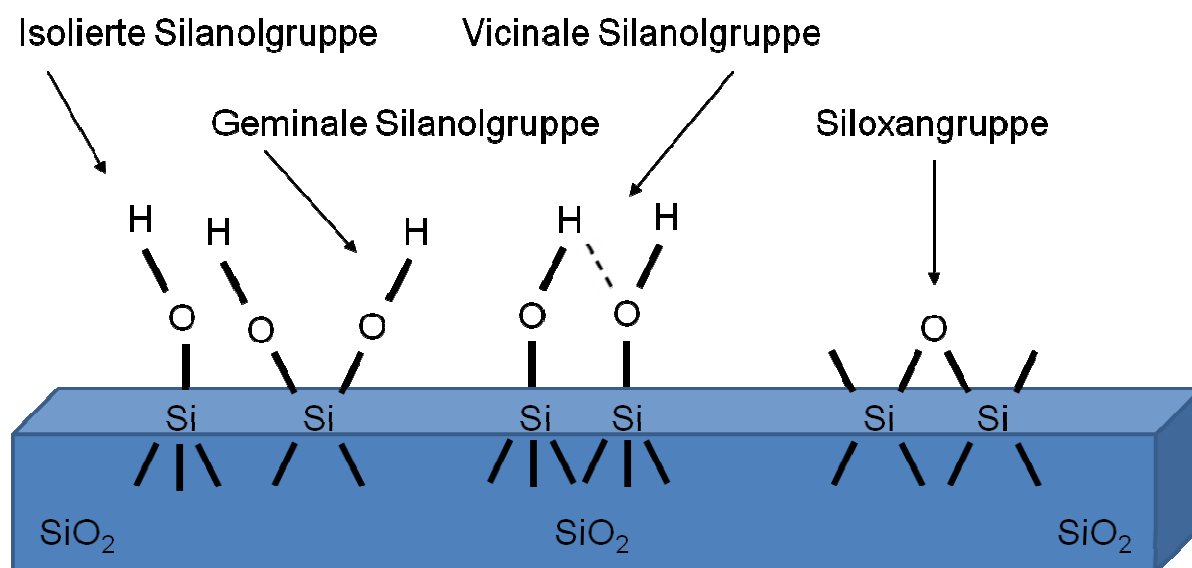


Abbildung 9: Unterschiedliche Silanolgruppen und Siloxangruppen auf der Oberfläche von amorphem Siliciumdioxid (in Anlehnung an ^[218]).

2.4.2. Anwendung von Siliciumdioxidnanopartikeln

Die auf der Oberfläche vorhandenen Silanolgruppen erlauben die Funktionalisierung mit unterschiedlichsten Organosiliciumverbindungen. Organosiliciumverbindungen werden beispielsweise in Form von Alkoxysilanen eingesetzt, dabei werden die drei Alkoxygruppen am Siliciumatom im ersten Schritt hydrolysiert, anschließend kondensieren die entstehenden Silanolderivate zu Oligomeren. Im weiteren Verlauf bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Oligomeren und den Hydroxylgruppen auf der Silicaoberfläche aus. Unter Wasserabspaltung folgt die finale kovalente Verknüpfung der beiden Spezies. Die einzelnen Reaktionen können auch konzertiert ablaufen. Im Normalfall bildet sich nur eine einzelne Bindung zwischen dem Siliciumatom der Organosiliciumverbindung und dem Substrat.^[221] Der gesamte Prozess wird als Silanisierung bezeichnet. So kann die Oberflächenchemie gezielt beeinflusst werden und für verschiedene Anwendungen und Experimente angepasst werden. Eine generelle Übersicht über organische Reaktionen auf Silicaoberflächen in wässrigen Systemen findet sich bei MINAKATA *et al.*^[222] Die Biokonjugation von Silicananopartikeln ist besonders im biomedizinischen Bereich von Interesse,^[223, 224] ebenso im Bereich der auf Silica basierten

Bionanotechnologie.^[225] Nachfolgend werden einige Beispiele für Anwendungen von Silicananopartikeln im biomedizinischen Bereich genannt.

Durch die gezielte Modifizierung von Silicananopartikeln können beispielsweise Oligonucleotide auf der Oberfläche immobilisiert werden, um sie als potentielle DNA-Biosensoren zu verwenden.^[226] Im Bereich der Biosensorik ist auch die Immobilisierung von Enzymen auf der Oberfläche, unter Erhalt ihrer enzymatischen Aktivität, beschrieben.^[227] Besonders der Bereich der bildgebenden Verfahren für biomedizinischen Anwendungen bietet Potential für die Verwendung von Nanopartikeln aus Siliciumdioxid.^[228] Für diese und andere Anwendungen werden kolloidale Silicapartikel mit fluoreszierenden Eigenschaften gezielt dargestellt.^[229-231] Für den Einsatz in der photodynamischen Therapie können Silicananopartikel kovalent mit einem Photosensibilisator gekoppelt werden.^[232] Sie können auch als gezieltes Transportsystem für Nucleinsäuren im biologischen Kontext eingesetzt werden.^[233, 234] Mesoporöse Nanopartikel aus Siliciumdioxid (MSNs) sind besonders wegen ihrer großen Oberfläche interessant für diverse Applikationen im biomedizinischen Kontext.^[235-238] Durch die Beladung der Partikel mit Biomolekülen in Kombination mit Oberflächenmodifizierungen ergeben sich weitreichende Möglichkeiten.

Dem potentiellen Nutzen von Silicananopartikeln stehen etwaige gesundheitliche Risiken der Partikelsysteme gegenüber. Dazu finden sich in der Literatur teilweise kontroverse Ansichten bezüglich der toxikologischen Eigenschaften. Während die Befürworter die gute biologische Verträglichkeit hervorheben (siehe oben), zeigen andere Arbeiten potentiell negative Effekte auf den Organismus. Von DUAN *et al.* wurden beispielsweise Einflüsse auf das kardiovaskuläre System bei Einwirkung von Silicananopartikeln auf Endothelzellen beschrieben.^[239] Die Größe der Partikel und die Ladung der Oberfläche haben einen Einfluss auf die Zytotoxizität.^[240] Das Agglomerationsverhalten von Partikeln in biologischen Medien führt zu veränderten physikalischen und chemischen Eigenschaften, die einen Einfluss auf die Zytotoxizität haben können.^[241] Letztendlich haben auch die Testbedingungen selbst einen Einfluss auf das toxikologische Verhalten.^[242] Eine gute Übersicht über *in vitro*- und *in vivo*-Studien an Silicananopartikeln findet sich bei NAPIERSKA *et al.*^[243]

Um endgültige Aussagen zur Toxizität von Siliciumdioxidnanopartikeln zu treffen, bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um das komplexe Zusammenspiel zwischen Nanopartikeln und biologischen Systemen zu verstehen.

2.5. Adsorption an Grenzflächen

2.5.1. Adsorption

An der Grenzfläche einer makroskopischen Phase können andere Moleküle oder Stoffe haften bleiben, dieser physikalische Vorgang wird als Adsorption bezeichnet. Die Ablösung eines adsorbierten Moleküls bzw. Stoffes wird als Desorption bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit ist die Phasengrenze zwischen fest und flüssig von Bedeutung, es werden Absorptionseigenschaften von funktionalisierten Nanopartikeln beim Kontakt mit der wässrigen Phase untersucht. Man unterscheidet dabei die Physisorption von der Chemisorption.^[210] Bei der Physisorption sind nur schwache Van-der-Waalsche-Kräfte beteiligt, es handelt sich um einen rein physikalischen Vorgang. Hierbei wird das Adsorbat auf der Oberfläche (Adsorbens) selbst nicht verändert und bleibt frei beweglich. Es werden also keine Bindungen gebrochen, es kann aber zu Verzerrungen und Polarisierungen im Molekül kommen. Typische Enthalpiewerte für Physisorptionen liegen im Bereich von etwa 20 kJ mol^{-1} .^[210] Abbildung 10 verdeutlicht schematisch den dynamischen Vorgang der Physisorption. Sobald die Geschwindigkeit der Adsorption neuer Moleküle gleich der Geschwindigkeit der Desorption alter Moleküle ist, stellt sich ein Adsorptionsgleichgewicht ein.^[213]

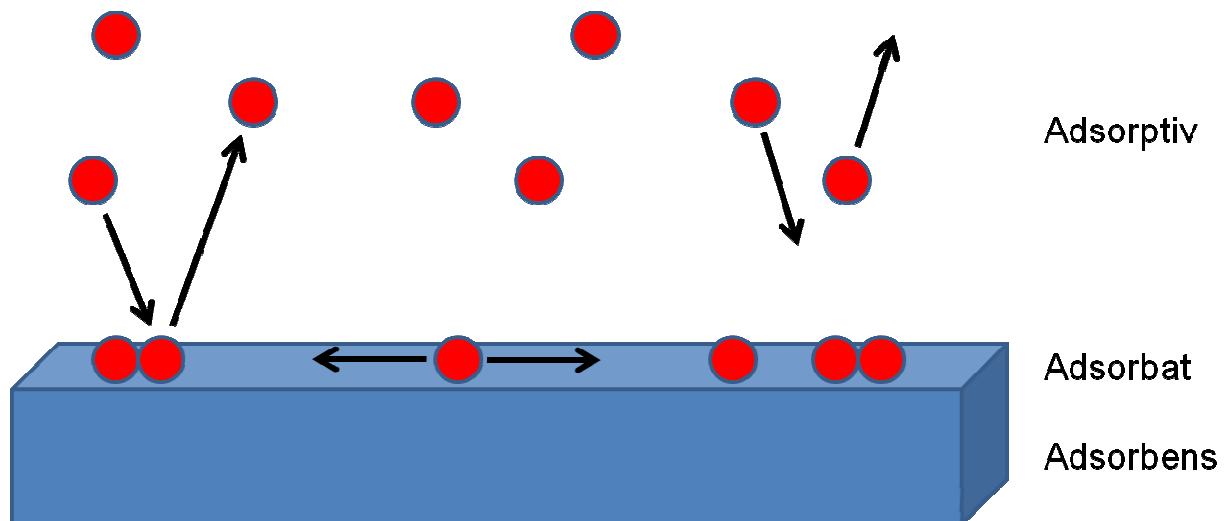


Abbildung 10: Schematische Darstellung der physikalischen Adsorption (Physisorption). Das Adsorptionsgleichgewicht stellt sich ein, wenn die Geschwindigkeit der Adsorption und die Geschwindigkeit der Desorption gleich sind.

Bei der Chemisorption wird das Adsorbat chemisch und damit fest auf der Oberfläche des Substrats gebunden, dabei handelt es sich meist um kovalente Bindungen. Die Enthalpie der Chemisorption ist mit etwa 200 kJ mol^{-1} wesentlich größer als bei der Physisorption.^[210] Moleküle können bei der Chemisorption in ihre einzelnen Atome zerfallen. Ein Beispiel hierfür ist die adsorptive Bindung von Wasserstoff auf Palladium, bei der Wasserstoff atomar auf dem Substrat adsorbiert.^[213]

Welche Art der Adsorption vorliegt und in welchem Ausmaß eine Adsorption auftritt, hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab.^[213] Hierzu zählen u. a. die chemische Natur des Adsorptivs und die des Adsorbens, die strukturelle Beschaffenheit der Oberfläche des Adsorbens, der Druck bzw. Konzentration des Adsorptivs, die Temperatur und die Gegenwart weiterer Adsorptive mit unterschiedlichen Adsorptionsaffinitäten.^[213] Eine quantitative Beschreibung der Adsorption kann durch den Bedeckungsgrad erfolgen. Der Bedeckungsgrad ist das Verhältnis der Anzahl der besetzten Adsorptionsstellen zu der Anzahl der insgesamt vorhandenen Adsorptionsstellen.^[210]

$$\theta = \frac{\text{Anzahl der besetzten Adsorptionsstellen}}{\text{Anzahl der vorhandenen Adsorptionsstellen}} \quad (2)$$

Gleichung (2) zeigt die mathematische Beschreibung des Bedeckungsgrades.

2.5.2. Ausbildung einer Proteinkorona auf der Nanopartikeloberfläche

Wie schon angedeutet, finden Nanopartikel in einer Vielzahl von Fragestellungen Verwendung, besonders ist der biomedizinische Kontext hervorzuheben. Sobald sich Nanopartikel in biologischen Medien befinden bzw. in das Blut übertreten, kommt es zur Ausbildung einer Proteinkorona an der Grenzfläche jedes einzelnen Partikels.^[131, 137, 138] Wenn Nanopartikel mit biologischen Systemen interagieren, so ist es nicht direkt die Oberfläche des Partikels, sondern oftmals die Korona, die für die »Identität« des Partikels verantwortlich ist.^[132] Hieraus ergeben sich vielfältige Fragestellungen, die die Wechselwirkungen mit Zellen, die toxikologischen Eigenschaften und auch die konformellen Änderungen der adsorbierten Proteine betreffen. Letzteres kann zur Exponierung neuer Epitope führen bzw. zu gänzlich veränderter Funktion der Proteine. Die Proteinkorona selbst kann auch Einfluss auf

die kolloidale Stabilität der Nanopartikel nehmen. Abbildung 11 zeigt schematisch die Entstehung einer Proteinkorona auf der Oberfläche eines Nanopartikels. Dabei adsorbieren die unterschiedlichen Proteine entsprechend ihrer Adsorptionsaffinität auf der Oberfläche.

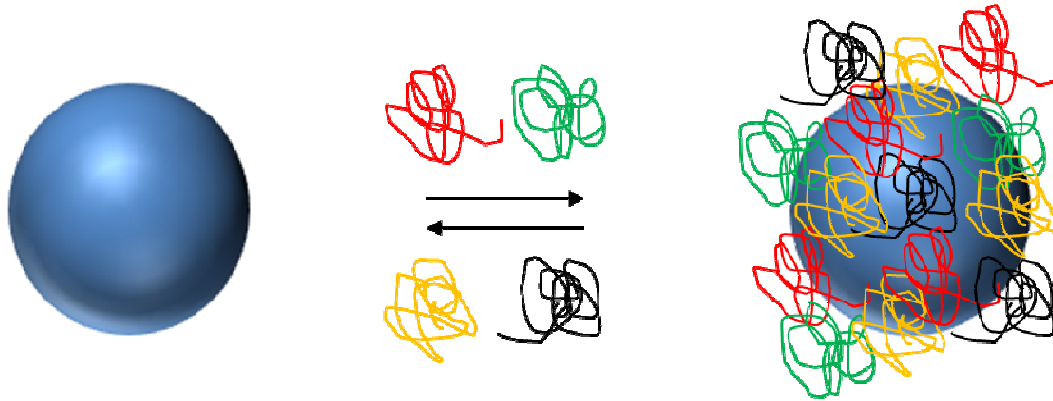


Abbildung 11: Adsorption von Proteinen im Kontakt mit biologischen Systemen auf der Oberfläche eines Nanopartikels. Hieraus resultiert die Ausbildung einer Proteinkorona.

Die Grenzfläche zwischen Nanomaterialien und biologischen Systemen wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst und ist sehr komplex.^[131] Sie wird als *nano-bio-interface* bezeichnet und ist geprägt durch dynamische Wechselwirkungen zwischen eigener Proteinkorona und fremden biologischen Grenzflächen.^[131] Zu beachten ist allerdings, dass neben Proteinen auch weitere Biomoleküle am Aufbau der Korona beteiligt sind. Die Proteinkorona wird strukturell in eine *hard*- und *soft*-Korona unterteilt.^[133, 137] Die *hard*-Korona besteht aus oberflächennahen und relativ fest gebundenen Proteinen. Die dynamische Austauschrate der adsorbierten Proteine mit dem umgebenden Medium ist wesentlich langsamer als in der *soft*-Korona.^[137] Die *soft*-Korona ist etwas weiter von der Oberfläche des Partikels entfernt als die *hard*-Korona und besteht aus einem lockeren Verbund von Proteinen. Die attraktiven Kräfte sind hier durch schwächere Wechselwirkungen geprägt. Dabei sind besonders Protein-Protein-Wechselwirkungen mit der *hard*-Korona von Bedeutung.^[133]

Die Proteinadsorption ist ein dynamischer Prozess, der durch ständige Austauschprozesse geprägt ist. Die Änderung der Zusammensetzung der Proteinkorona im zeitlichen Verlauf wird als Vroman-Effekt bezeichnet.^[133, 244] Die

Kinetik der Proteinadsorption wird durch Faktoren wie die Kontakthäufigkeit mit der Oberfläche, die Konzentration, die Diffusionsgeschwindigkeit der Proteine und die Wechselwirkung mit der Oberfläche bestimmt.^[133] Die Desorptionskinetik wird hauptsächlich durch die Bindungsenergie der Protein-Nanopartikel-Assoziation bestimmt.^[133] Eine quantitative, mathematische Beschreibung der komplexen Vorgänge bei der Ausbildung einer Proteinkorona wird beispielsweise von DARABI SAHNEH *et al.* beschrieben.^[245]

Viele Nanopartikel werden gezielt auf ihrer Oberfläche funktionalisiert, um eine spezifische Adressierung im biologischen System zu ermöglichen.^[103, 104] Dieses *targeting* funktioniert in der Theorie sehr gut, es stellt sich aber grundsätzlich die Frage, welchen Einfluss die Proteinkorona im biologischen Kontext auf die Effizienz diese *targeting* ausübt. Es konnte im Modell gezeigt werden, dass die Proteinkorona zu einer Verminderung des angestrebten *targeting* führt.^[246] Dieser Einfluss sollte bei zukünftigen Oberflächenmodifizierungen bedacht werden. Hierzu sind weitergehende und grundsätzliche Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten im biologischen Kontext nötig.

Albumin ist ein Plasmaprotein und macht ca. 60 % aller Plasmaproteine aus.^[204] Es ist hauptsächlich an der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks beteiligt und erfüllt darüber hinaus die Funktion als unspezifisches Transportprotein im Plasma.^[204] Es wird daher in der bovinen Form als Modellprotein für Adsorptionsuntersuchungen in der vorliegenden Arbeit verwendet. Abbildung 12 zeigt die Struktur von bovinem Serumalbumin.

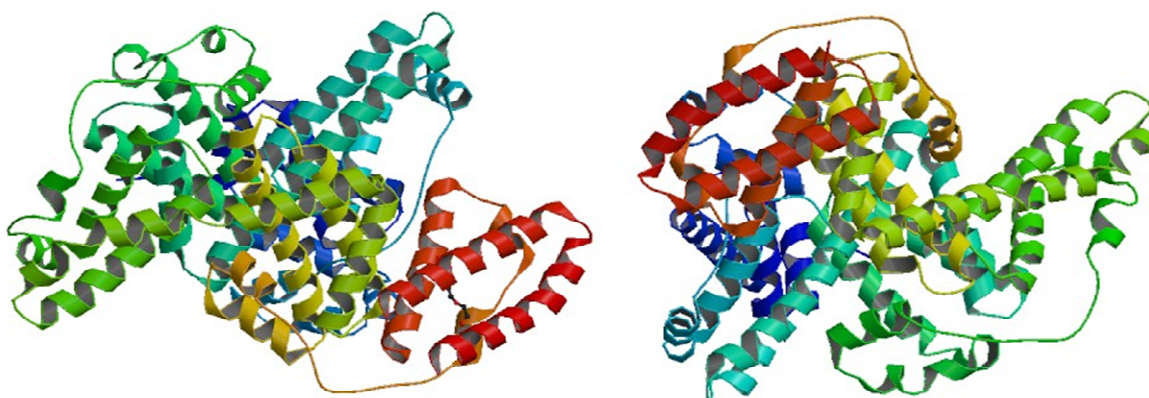


Abbildung 12: Angenommene makromolekulare, biologische Strukturen von bovinem Serumalbumin (BSA). Bilder entnommen aus RCSB PDB (www.pdb.org). PDB ID 4F5S von BUJACZ.^[164]

3. Geräte und Methoden

3.1. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM, engl. *scanning electron microscopy*, SEM) ist ein Verfahren zur Betrachtung kleinster Strukturen. Durch die vergrößerte Abbildung können kleinste Elemente und Oberflächentopografien dargestellt werden, die durch ein herkömmliches Lichtmikroskop nicht mehr dargestellt werden können. Lichtmikroskope haben funktionsbedingt ein limitiertes Auflösungsvermögen. Beim Rasterelektronenmikroskop wird ein Elektronenstrahl anstatt eines Lichtstrahls verwendet. Die Wellenlänge der Elektronen ist wesentlich kleiner als die Wellenlänge des sichtbaren Lichts. Das REM weist eine große Tiefenschärfe auf, und es können Auflösungen von bis zu wenigen Nanometern erreicht werden.^[34]

Der Elektronenstrahl wird von einer Glühkathode, der Strahlungsquelle, generiert. Der komplette Vorgang findet im Hochvakuum ($< 10^{-2}$ Pa)^[34] statt, um eine Wechselwirkung zwischen Elektronen und Luftmolekülen zu vermeiden. Die Elektronen werden in einem elektrischen Feld von mehreren tausend Volt beschleunigt und durch ein elektromagnetisches Linsensystem auf die zu untersuchende Probe fokussiert. Dabei rastert der Elektronenstrahl nacheinander Punkt für Punkt der Probenoberfläche ab. Treffen die Elektronen auf die Oberfläche, so werden sie abgebremst und geben ihre kinetische Energie an die Probe ab. Dabei werden Sekundärelektronen aus den Atomen der Probe freigesetzt, die durch einen Sekundärelektronendetektor detektiert werden. Die Helligkeit der einzelnen Bildpunkte wird über die emittierte Menge an Sekundärelektronen, die vom zuvor abgerasterten Flächenelement freigesetzt worden sind, erzeugt. Aus den so generierten Daten entsteht ein kontrastreiches Hell-dunkel-Bild der untersuchten Probe. Je nach Ausbreitung der gestreuten Sekundärelektronen und nach Durchmesser des Elektronenstrahls wird das Auflösungsvermögen bestimmt. Die gesamte Probe wird vor der eigentlichen Untersuchung mit einer dünnen Schicht aus Gold oder Kohlenstoff bedampft („Sputtern“), um die Aufladung von elektrisch nicht leitenden Proben durch den Elektronenstrahl zu vermeiden.^[34] Häufig wird zusätzlich Palladium zum Bedampfen verwendet. Bei unzureichend bedampften Proben entstehen durch elektrisch aufgeladene Kompartimente störende, helle Artefakte im Bild. Als REM-Träger werden Silicium-Wafer oder Kohlenstoff-Oberflächen benutzt.

3.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM, engl. *transmission electron microscopy*) kann als Analogon zur konventionellen Durchlichtmikroskopie betrachtet werden. Bei diesem Verfahren wird ebenfalls ein Elektronenstrahl zur Abbildung kleinster Strukturen verwendet. Die Auflösung dabei ist deutlich höher als bei der Rasterelektronenmikroskopie, die Tiefenschärfe ist hingegen reduziert. Um Auflösungen bis in den atomaren Bereich zu ermöglichen, bedient man sich der hochauflösenden Transmissionselektronenmikroskopie (HRTEM).^[34] Die Proben werden dabei mit dem Elektronenstrahl durchstrahlt, wodurch man einen Einblick in die Struktur der Probe erhält. Die Proben müssen dafür sehr dünn (0,05-0,2 µm) sein, um eine vollständige Absorption der Elektronen zu vermeiden.^[34] Die erzeugten Elektronen werden wie bei der Rasterelektronenmikroskopie durch eine angelegte Spannung beschleunigt und durch ein elektrisches bzw. magnetisches Linsensystem auf die Probe fokussiert. Beim Kontakt des Elektronenstrahls mit den Atomen der Probe kommt es zu elastischen und inelastischen Streuphänomenen. Durch die Auswertung der durch die Wechselwirkung mit der Probe manipulierten Elektronen kann mittels eines Linsensystems und mittels elektronischer Verarbeitung ein Bild der Probe generiert werden.

Bei dünnen kristallinen Festkörpern können durch geeignete Konfigurationen des apparativen Systems auch kristallographische Informationen und Beugungsbilder von sehr kleinen Flächenelementen der Probe generiert werden.^[34]

3.3. Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX, engl. *energy dispersive X-ray spectroscopy*) ist ein analytisches Verfahren zur Bestimmung der elementaren Zusammensetzung einer Probe, apparativ ist sie oft an elektronenmikroskopische Systeme gekoppelt. Beim Kontakt des vom Rasterelektronenmikroskops generierten Elektronenstrahls mit den Atomen der zu untersuchenden Probe kommt es zur Emission von elementspezifischer Röntgenstrahlung (charakteristische Röntgenstrahlung).^[34] Wenn die Elektronen mit hoher Energie auf die Probe treffen, werden Elektronen aus den inneren Schalen der Probeatome herausgeschlagen. Die Röntgenemission erklärt sich durch die Auffüllung der entstandenen Lücken mit energiereicheren Elektronen aus äußeren Schalen. Die dabei freiwerdende Energie wird in Form von Röntgenquanten abgegeben. Da der Durchmesser des

Elektronenstrahls sehr klein ist, kann die elementare Zusammensetzung der Probe mit hoher Ortsauflösung analysiert werden.^[34] Durch die Detektion der charakteristischen Röntgenstrahlung und dem anschließenden Abgleich mit einer Datenbank kann die Röntgenemission einem entsprechendem Element zugeordnet werden. Die Intensität der Signale ist dabei proportional zur enthaltenen relativen Menge des Elements.

3.4. Infrarotspektroskopie (IR)

Die Infrarotspektroskopie ist ein physikalisches Verfahren zur Identifizierung von funktionellen Gruppen. Durch die Absorption von Strahlung im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums können Moleküle zu mechanischen Schwingungen angeregt werden. Werden die Atome aus ihrer Ruhelage durch Energieabsorption ausgelenkt, so ergeben sich charakteristische Schwingungen, die sich aus der Summation einzelner Bewegungen ergeben. Als Bedingung für die IR-Aktivität einer Schwingung wird die Veränderung des Dipolmoments während des Schwingungsvorgangs gefordert, man unterscheidet Valenzschwingungen und Deformationsschwingungen.^[247] Wird mit der eingestrahlten Strahlung die Resonanzbedingung des schwingenden Dipols erreicht, so kann Energie zur Schwingungsanregung aufgenommen werden. Da unterschiedliche Schwingungszustände jeweils eine charakteristische Resonanzbedingung aufweisen, kann die Infrarotspektroskopie zur Strukturaufklärung herangezogen werden. In einem IR-Spektrum wird die Durchlässigkeit (Transmission) gegen die reziproke Wellenlänge (Wellenzahl) dargestellt. Die Lage der Signale im Spektrum hängt naturgemäß von der Art der in der zu untersuchenden Verbindung enthaltenen funktionellen Gruppen ab. Betrachtet man das gesamte Spektrum einer Verbindung, so ist es für diese charakteristisch. Das typische IR-Spektrum umfasst einen Bereich zwischen 400 cm^{-1} und 4000 cm^{-1} .^[247]

Im Verlauf der Messung werden die unterschiedlichen Wellenlängenbereiche der infraroten Strahlung nacheinander durch die zu untersuchende Probe geleitet und die Absorptionsbanden erfasst. Eine Alternative stellt die Fourier-Transform-IR-Spektroskopie da, bei der sämtliche Frequenzen simultan erfasst werden und bei der das Michelson-Interferometerprinzip verwendet wird.^[247] Die daraus erhaltenen Intensitäten werden mathematisch durch eine Fouriertransformation in ein

herkömmliches IR-Spektrum umgerechnet. Diese Methode zeigt ein verbessertes Auflösungsvermögen gegenüber dem herkömmlichen Verfahren.^[247]

3.5. UV-Vis-Spektroskopie (UV/Vis)

Bei der UV-Vis-Spektroskopie werden Absorptionsspektren im Bereich des ultravioletten (UV, 200 nm bis 400 nm) und des sichtbaren (Vis, 400 nm bis 800 nm) Wellenlängenbereichs aufgenommen. Die eingestrahlte elektromagnetische Strahlung bewirkt eine Wechselwirkung mit den Valenzelektronen der zu untersuchenden Verbindung. Diese werden durch Energieabsorption angeregt und auf ein höheres Energieniveau promoviert. Zur Aufnahme eines Spektrums wird Licht unter kontinuierlicher Variation der Wellenlänge im oben erwähnten Bereich durch eine Probe geschickt. Bei geeigneter Wellenlänge können Moleküle im elektronischen Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand überführt werden. Erlaubte Elektronenübergänge werden als Signale im UV-Vis-Spektrum sichtbar. Angeregte Elektronen kehren nach der Lichtabsorption durch spontane oder induzierte Emission in ihren Grundzustand zurück. Anhand der Absorptionsbanden können funktionelle Gruppen (Chromophore) qualitativ erfasst werden. Nach entsprechender Kalibration bei einer bestimmten Wellenlänge sind auch quantitative Konzentrationsbestimmungen möglich.

Hierbei kommt das Lambert-Beersche Gesetz zur Anwendung. Es gilt nur für verdünnte Lösungen und bei Verwendung von monochromatischem Licht:^[247, 248]

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3)$$

E = Extinktion

I_0 = Intensität des eingestrahlten Lichtstrahls

I = Intensität des transmittierten Lichtstrahls

ε = Extinktionskoeffizient bzw. Absorptionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke bzw. Küvettendicke

Die Konzentration wird in mol L^{-1} und die Schicht- bzw. Küvettendicke in cm angegeben. Üblicherweise weisen Küvetten eine Dicke von einem cm auf, so dass sich vereinfacht folgender Ausdruck ergibt:

$$E = \varepsilon \cdot c \quad (4)$$

Hieraus wird ersichtlich, dass die Konzentration direkt proportional zur Extinktion ist. Bei einer Konzentration von 1 mol L^{-1} entspricht die Extinktion dem Extinktionskoeffizienten bzw. Absorptionskoeffizienten.

3.6. Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die dynamische Differenzkalorimetrie (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) ist ein thermoanalytisches Verfahren zur Messung von aufgenommenen oder abgegebenen Wärmemengen einer zu untersuchenden Probe. Untersucht wird das kalorische Verhalten der Probe. Die Ergebnisse werden in einem Thermogramm festgehalten, welches Phasenübergänge, Änderungen des Aggregatzustandes, Glasumwandlung und den Ablauf von chemischen Reaktionen widerspiegelt.^[247, 249]

Die Probe wird zusammen mit einer Referenzsubstanz analysiert, wobei beide Proben einem Temperaturprogramm mit konstanter Heiz- bzw. Abkühlungsrate unterworfen werden. Sofern chemische Reaktionen und exotherme oder endotherme Vorgänge in der Probe stattfinden, kommt es in entsprechenden Temperaturbereichen zur Abweichung des linearen Temperaturverlaufs und zur Bildung von Wärmeströmen. Diese Wärmeströme können je nach Reaktion in bzw. aus der Probe hinaus gehen. Die Temperaturveränderungen werden dabei im Vergleich zur Referenzprobe erfasst. Um die feinen Temperaturdifferenzen zwischen der Probe und der Referenzsubstanz zu detektieren, werden Thermoelemente mit einer hohen Empfindlichkeit verwendet. Im Bereich der apparativen Messmethodik haben sich zwei Verfahren etabliert, die Leistungskompensations-DSC und die Wärmestrom-DSC.^[247, 249] Für die Messungen wurde ein kalibriertes Wärmestrom-DSC mit angeschlossener flüssig-N₂-Kühleinheit verwendet. Die Probemengen betrugen ca. 5 bis 14 mg. Die Proben wurden in Aluminiumtiegel bei Umgebungsdruck in Luftatmosphäre gemessen. Die Heizrate der Messungen betrug 2 K min^{-1} in einem Temperaturbereich von ca. 25 °C bis 100 °C.

3.7. Thermogravimetrie (TG)

Die Thermogravimetrie (TG) misst bei definierter Atmosphäre die Massenänderung einer Probe, die einem Temperaturprogramm unterworfen wird. Mit einer Thermowaage wird der Massenverlust detektiert, der durch diverse Zersetzungsprozesse initiiert werden kann. In einem Thermogramm wird der Massenverlust in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Typisch ist ein stufenförmiger Verlauf der Massenabnahme, der auf unterschiedliche Stoffumwandlungen in der Probe zurückzuführen ist. Für die Wahl der Ofenatmosphäre kommt zum einen Sauerstoff in Betracht (oxidative Zersetzungsprozesse) und zum anderen inerte Atmosphären aus Stickstoff oder Argon (pyrolytische Zersetzungsprozesse).^[249] Die wichtigsten Anwendungsgebiete der Thermogravimetrie liegen in der Gehaltsbestimmung und der Erfassung von Zersetzungsparametern wie Temperatur und Verlauf der Reaktion.^[249] Die bei der Reaktion freiwerdenden, gasförmigen Zersetzungsprodukte können weiter analysiert werden, indem die TG mit anderen Methoden wie der Infrarotspektroskopie oder Massenspektroskopie gekoppelt wird. Für die Messungen wurden offene Keramiktiegel aus Al_2O_3 verwendet. Die Probemengen betrugen ca. 90 mg bis 160 mg. Die Messungen wurden unter dynamischer Sauerstoffatmosphäre durchgeführt. Die Durchflussrate des Gases betrug 50 mL min^{-1} bei einer Heizrate von 2 K min^{-1} .

3.8. Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS, engl. *dynamic light scattering*) ist ein Verfahren zur Größenbestimmung von kolloidalen Partikeln sowie zur Bestimmung des Dispersionsgrades. Bei kolloid-dispersen Systemen sind die einzelnen Partikel in einer ständigen, zufälligen Bewegung, der sogenannten Brownschen Molekularbewegung. Die Geschwindigkeit der Partikel folgt dabei dem Maxwell-Boltzmann-Verteilungsgesetz.^[90] Bei der Dynamischen Lichtstreuung wird das Licht eines Lasers an kolloidalen Partikeln gestreut. An kolloidalen Lösungen lässt sich der Tyndall-Effekt nachweisen; bestrahlt man eine Probe mit einem Laserstrahl, so zerstreuen die kolloid-dispersen Teilchen das Licht in alle Richtungen. Das Streulicht kann von einem Detektor gemessen werden. Durch die ständige Bewegung der Teilchen und die kontinuierliche Lichtbestrahlung kommt es zu konstruktiven und destruktiven Interferenzen des gestreuten Lichts, hieraus resultieren Fluktuationen der Streustrahlungsintensität. Ein Photonenkorrelator ermittelt die zeitlichen

Korrelationen in den Fluktuationen der Lichtintensität.^[90] Über die Autokorrelationsfunktion kann die Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen errechnet werden, entscheidend hierbei ist die Korrelation von Zeit und Lichtintensität. Wird die Viskosität des Dispersionsmittels berücksichtigt, lässt sich der hydrodynamische Radius der kolloid-dispersen Partikel durch die Stokes-Einstein-Beziehung bestimmen.^[90, 212]

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (5)$$

D = Diffusionskoeffizient

k_B = Boltzman-Konstante

T = Temperatur

η = Viskosität des Dispersionsmittels

R_h = Hydrodynamischer Durchmesser

Für ein monodisperses System ist die Autokorrelationsfunktion eine einfache exponentielle Abklingfunktion.^[90] Für polydisperse Systeme ändert sich die Funktion und nimmt komplexere Formen an, was die Berechnung wesentlich erschwert.^[90] Die Größenverteilung der Teilchen kann aus der mathematischen Beschreibung der Funktion intern ermittelt werden und wird als Polydispersitätsindex (PDI) bezeichnet. Der Polydispersitätsindex beschreibt die Dispersität von kolloidalen Partikeln in einem System. Für streng monodisperse Systeme hat der PDI einen Wert von 0, bis zu einem Wert von 0,3 wird ein System noch als monodispers angesehen und ab einem PDI von 0,5 spricht man von einer polydispersen Größenverteilung.^[212]

Neben der Größenbestimmung kann auch das Zetapotential (vgl. Kap. 2.3.3) separat erfasst werden. Das Zetapotential kann durch die Messung der Teilchengeschwindigkeit in einem elektrischen Feld bestimmt werden.^[90] Mit Hilfe des Zetapotentials können Aussagen über die elektrostatische Stabilität von Kolloiden gemacht werden. Ist das Zetapotential größer als +30 mV bzw. kleiner als -30 mV, so werden Kolloide als elektrostatisch stabil angesehen.^[214]

3.9. Analytische Scheibenzentrifugation (DCS)

Die analytische Scheibenzentrifugation (DCS, engl. *differential centrifugal sedimentation*) ist ein Verfahren zur Größenbestimmung von dispergierten Partikeln. Es können Partikel in einem Größenbereich von ca. 5 nm bis 50 µm untersucht werden, dabei können die Partikel sowohl in Wasser als auch in organischen Lösemitteln dispergiert sein.^[250, 251] Die Größe der Partikel wird bei diesem Verfahren über die Sedimentationsgeschwindigkeit ermittelt. Befinden sich Partikel in einem Schwerfeld, so sedimentieren sie entsprechend ihrer Größe und Dichte. Die Scheibenzentrifuge nutzt die Sedimentation nach Stokes.^[251] Die Größe der Partikel kann sehr genau unterschieden werden, da die Sedimentationsgeschwindigkeit mit dem Quadrat der Partikelgröße wächst. Auch bei kleinen Unterschieden in der Teilchengröße kommt es zu deutlichen Veränderungen der Sedimentationsgeschwindigkeit.^[251] Bei der Sedimentation handelt es sich um einen Vorgang, der nur sehr langsam voranschreitet. Je kleiner die Partikel sind und je niedriger die Dichte der Teilchen ist, desto langsamer ist der Sedimentationsprozess. Um die Sedimentation zu beschleunigen, nutzt die Scheibenzentrifuge die differentielle Sedimentation.^[251] Bei diesem Verfahren wird die Zentrifugalkraft genutzt und die Partikel entsprechend ihrer Größe und Dichte in Bänder gleich großer Teilchen aufgespalten, die zum äußeren Rand der Scheibe wandern und von einem Detektor erkannt werden können. Die Probe wird in die Mitte einer hohlen Scheibe injiziert, von wo aus alle Partikel zum Zeitpunkt Null starten. Die Rotation der Scheibe ist mit bis zu 24000 Umdrehungen pro Minute sehr hoch.^[251] Im Inneren der Scheibe befindet sich eine Flüssigkeit, in der ein Dichtegradient aus konzentrierten Saccharoselösungen die Aufspaltung unterschiedlich großer Partikel weiter verstärkt. Dadurch kommen die unterschiedlich großen Partikel zeitverzögert am Detektor an. Dieser nutzt die monochromatische Lichtabsorption als Detektionsgrundlage. Die Sedimentationszeit der Partikel bis zum Detektor und die gemessene Lichtabsorption ermöglichen die Berechnung der Partikelgröße nach dem Stokeschen Gesetz und der Mie-Theorie.^[251] Der Durchmesser wird durch folgende Formel berechnet:^[250]

$$d = \sqrt{\frac{18\eta \cdot \ln \frac{r_f}{r_0}}{(\rho_P - \rho_F) \cdot \omega^2 \cdot t}} \quad (6)$$

d = Durchmesser der zu untersuchenden Partikel

η = Viskosität der Flüssigkeit

r_f = Radius der Scheibe am Detektionspunkt

r_0 = Radius der Scheibe am Probeneinlass

ρ_P = Dichte der Partikel

ρ_F = Dichte der Flüssigkeit

ω = Rotationsgeschwindigkeit der Scheibe

t = Sedimentationszeit der Partikel entlang des Weges von r_0 bis r_f

Sind Rotationsgeschwindigkeit und Temperatur konstant, so bleiben dies auch die Parameter während des Betriebs der Scheibenzentrifuge, ausgenommen davon ist die Sedimentationszeit. Daher werden die Parameter zu einer Konstanten K zusammengefasst:^[250]

$$d = K \cdot \sqrt{\frac{1}{t}} \quad (7)$$

K = Kombination der Parameter aus Gleichung (6)

t = Sedimentationszeit bis zum Detektor

Die Genauigkeit der Messung wird maßgeblich durch die in Gleichung (6) eingesetzten Parameter bestimmt. Durch die Berücksichtigung der Gleichung (7) kann die Genauigkeit der Messung erhöht werden, wenn ein Kalibrationsstandard mit enger Größenverteilung zur Bestimmung von K verwendet wird.^[250]

3.10. Elementaranalyse (EA)

Die Elementaranalyse (EA) untersucht Proben hinsichtlich ihrer Zusammensetzung. Sie kann die Elemente Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel in anorganischen und organischen Verbindungen detektieren. Die zu untersuchenden

Elemente werden bei hohen Temperaturen von ca. 900 °C mit Sauerstoff zu ihren entsprechenden Oxiden umgesetzt. Die dabei entstehenden Gase werden in einer Gaschromatographiesäule aufgetrennt. Hierbei wird Helium als Trägergas verwendet. Die Detektion erfolgt über Wärmeleitfähigkeitssensoren.^[252]

3.11. Röntgendiffraktometrie (XRD)

Die Röntgendiffraktometrie (XRD, engl. *X-ray diffraction*) ist ein Verfahren zur Bestimmung von Kristallstrukturen in Festkörpern, entscheidend sind dabei die Interferenzphänomene. Bestrahlt man einen Kristall mit Röntgenstrahlung, so werden die elektromagnetischen Wellen an den Netzebenen der Atome unter bestimmten diskreten Winkeln gebeugt. Die Wellenlänge der Röntgenstrahlung beträgt ca. 100 pm und liegt damit im Bereich der Gitterkonstanten von Kristallen.^[34] Da es eine Vielzahl von Netzebenen in einem Kristall gibt, kommt es zu konstruktiven und destruktiven Interferenzen der gebeugten Strahlung. Beugungsreflexe lassen sich nur beobachten, wenn die Weglängendifferenz zweier paralleler Strahlen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist. Nur unter gewissen Winkeln (Braggscher Winkel) tritt diese konstruktive Interferenz in Erscheinung.^[210] Andernfalls löschen sich die elektromagnetischen Wellen durch destruktive Interferenz aus. Mathematisch wird dieser Zusammenhang durch das Braggsche Gesetz beschrieben.^[34, 210]

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin\theta \quad (8)$$

n = Beugungsordnung

λ = Wellenlänge

d = Netzebenenabstand

θ = Beugungswinkel

Aus den ermittelten Röntgenbeugungsdaten können durch komplexe mathematische Operationen Kristallstrukturen ermittelt werden, die durch Modellierungsverfahren noch präzisiert werden können.^[210] Die aufgenommenen Diffraktogramme sind charakteristisch für eine kristalline Probe und können mit Datenbanken abgeglichen werden. Generell unterscheidet man zwischen der Einkristalldiffraktometrie und der Röntgenpulverdiffraktometrie.^[34]

3.12. Mechanische Untersuchungsmethoden

Für die Auslegung und Konstruktion von Biomaterialien als Knochenersatz ist die Kenntnis mechanischer Kenngrößen von elementarer Bedeutung. Wenn neue Werkstoffe entwickelt werden ist es wichtig, das Verhalten von Werkstoffen unter mechanischer Beanspruchung (Krafteinwirkung) zu kennen und vorherzusagen. Die in diesem Bereich angesiedelten Verfahren sind Bestandteil der Werkstoffprüfung. Im Bereich der Osteosynthesematerialien und Implantatentwicklung werden seitens der Medizin gewisse Anforderungen an moderne Materialien gestellt. Bei der Umsetzung eines speziellen Produktdesigns kommt dem Stabilitätsaspekt daher eine tragende Rolle zu. Definierte mechanische Untersuchungsmethoden bilden die Grundlage für die Ermittlung werkstoffspezifischer Kennwerte. Bei der Biomaterialentwicklung sind es mechanische Kenngrößen wie Bruchfestigkeit, Härte, Haftung und Elastizität, die entsprechend der Anforderungen umgesetzt und optimiert werden müssen.^[34] Standardisierte Prüfverfahren und entsprechende DIN-Normen sorgen für eine Vergleichbarkeit von ermittelten Daten, da die Ergebnisse stark von der gewählten apparativen Umsetzung der Testverfahren abhängen.^[34]

Unter der Einwirkung von äußeren Kräften auf ein Werkstück treten Form- und Volumenveränderungen (Deformationen) auf.^[253] In einem Spannungs-Dehnungs-Diagramm kann dargestellt werden, wie sich Material unter dem Einfluss von mechanischer Spannung verhält. Man spricht von einem elastischen Verhalten, wenn die Probe nach Wegnahme der Spannung in ihren ursprünglichen Zustand ohne bleibende Deformationen zurückkehrt. In diesem Bereich ist die Dehnung proportional zur ausgeübten mechanischen Spannung (Proportionalitätsbereich).^[210, 253] Wird die Probe über diesen Bereich hinaus gedehnt, so erreicht das Material die Fließgrenze bzw. Dehngrenze. In diesem Bereich führt eine weitere Dehnung zu bleibenden plastischen Verformungen des Materials,^[34, 210] es treten Gefügeänderungen auf atomarer Ebene ein.^[253] Bei ideal spröden Materialien kommt es in diesem Bereich des Spannungs-Dehnungs-Diagramms zum Bruch des Materials. Die genauen und exakten Vorgänge, die das mechanische Verhalten eines Materials beschreiben, sind bis dato aber noch unzureichend erforscht.^[34] Im Proportionalitätsbereich des Spannungs-Dehnungs-Diagramms gibt die Steigung den E-Modul (Elastizitätsmodul) bzw. den Youngschen Modul des Materials an.^[210] Je härter – *ergo* weniger verformbar – ein Material ist, desto höher ist der Elastizitätsmodul des Werkstoffs.^[34] Liegt die größtmögliche Spannung an, die ein

Material aushalten kann, so ist die maximale Zugspannung (Zugfestigkeit) erreicht.^[34, 210]

Eine Übersicht über potentiell mögliche, äußere Kräfte und die Auswirkungen auf ein Material sind in Tabelle 2 gegeben.

Tabelle 2: Die Auswirkungen äußerer Kräfte auf ein Material (entnommen aus ^[253]).

Vorgang	Formänderung	Volumenänderung
Dehnung	Ja	Ja
Kompressibilität	Nein	Ja
Scherung	Ja	Nein

Im Elastizitätsbereich bzw. im Proportionalitätsbereich des Spannungs-Dehnungs-Diagramms gilt das Hooke'sche Gesetz. Mathematisch lassen sich die oben geschilderten Zusammenhänge wie folgt ausdrücken.^[253]

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (9)$$

Hierbei gilt:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (10)$$

und:

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L} \quad (11)$$

σ = Spannung

E = Elastizitätsmodul

ε = Dehnung

F = Kraft

A = Querschnittsfläche

ΔL = Längenänderung unter Krafteinwirkung

L = Ausgangslänge

Bei der Dreipunktbiegung handelt es sich um ein mechanisches Prüfverfahren aus der Werkstofftechnik zur Untersuchung des Biegeverhaltens von definierten Prüfkörpern. Anhand der Spannungs-Dehnungs-Beziehungen können wichtige mechanische Kenngrößen ermittelt werden.^[62] Die Methode der Dreipunktbiegung wurde in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften der Kompositmaterialien verwendet. Es wurden der *E*-Modul und die maximale Biegespannung bestimmt, beides sind wichtige Kenngrößen im Bereich der Biomaterialentwicklung. Hierzu wurden genormte Probekörper angefertigt, die sich an die ISO-EN-Norm 178 für Kunststoffe anlehnen.^[62] Die ISO-Norm legt auch die genauen Prüfbedingungen für die Messung fest. Abbildung 13 zeigt den Versuchsaufbau für die Dreipunktbiegeversuche.

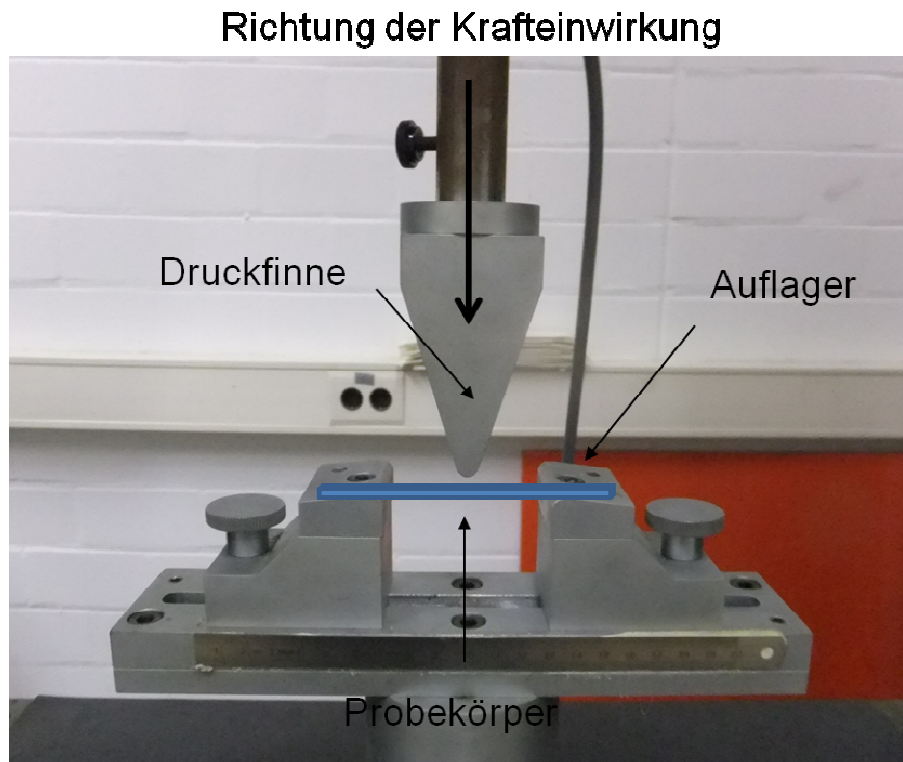


Abbildung 13: Versuchsaufbau zur Dreipunktbiegung.

Bei der Dreipunktbiegung wird der Probekörper (Biegebruchstab) auf zwei Auflager gelegt und anschließend mit einer aufgebrachten Kraft belastet, bis es zum Bruch der Probe kommt.^[62] Dabei wird die Druckfinne mit konstanter Vorschubgeschwindigkeit geführt, gleichzeitig werden die auftretenden Kräfte gemessen und in einem Spannungs-Dehnungs-Diagramm grafisch dargestellt.

3.13. Verarbeitungsmethoden – Begasungsverfahren

Um biokompatible Werkstoffe mit einer definierten Geometrie zu erhalten, sind geeignete Verarbeitungsmethoden anzuwenden. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kompositmaterialien liegen zunächst in Pulverform vor. Um daraus Probekörper herzustellen und in Zukunft komplexere Implantate fertigen zu können, wird ein etabliertes Begasungsverfahren bzw. Schäumungsverfahren angewendet. Mit dieser Methode ist es möglich, in einem polymeren Werkstoff poröse Strukturen zu erzeugen, gleichzeitig entsteht aus dem Pulver ein festes Werkstück. Das Verfahren nutzt die Druckabhängigkeit der Gasabsorption. Die Werkstoffverarbeitung wird mit einem Autoklaven durchgeführt, der in Abbildung 14 zu sehen ist.

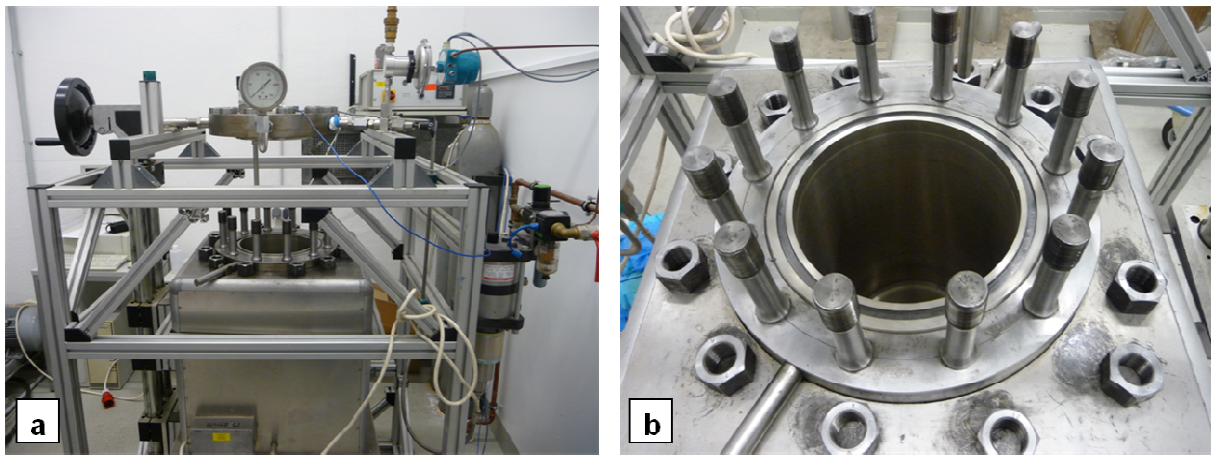


Abbildung 14: Autoklav zum Begasen von amorphen Polymeren: a) Autoklav mit angeschlossener Temperaturregelung, Pumpe zur Gaskompression, Druckgasflasche und elektronisch gesteuerten Druckregler, b) Blick in das Innere des Autoklaven.

Dazu wird das Material in eine gasdurchlässige PTFE-Hohlform gefüllt und verschlossen in den Autoklaven hineingestellt. Nun wird die Probe mit überkritischem Kohlenstoffdioxid begast, wobei der Druck und die Temperatur kontrolliert werden können (kritische Temperatur von CO_2 , $T_c = 31\text{ °C}$). Der Druck während des Versuchs lag bei 100 bar und die Temperatur bei 37 °C . Das Kohlenstoffdioxid dringt in die Probe ein (Begasungszeit 2 h) und erzeugt bei der anschließenden Dekompression Blasen im Inneren der Probe. Während der Dekompression erstarrt das zuvor in einem schmelzähnlichen Zustand gewesene Polymer zu einem porösen Formkörper. Durch die Begasung verringert sich die Glasübergangstemperatur von

amorphen Polymeren deutlich, was auf intermolekulare Wechselwirkungen zwischen dem Kohlenstoffdioxid und dem Polymer zurückzuführen ist.^[69, 73] Die Struktur der entstehenden Polymerschäume kann durch Variation der Prozessparameter beeinflusst werden. Eine ausführliche theoretische Diskussion der zugrunde liegenden physikalischen Zusammenhänge der Porenbildung findet sich in der Dissertation von SCHILLER.^[57] Das Begasungsverfahren eignet sich besonders für die Einbringung von thermolabilen Wirkstoffen und Substanzen in das Material, da die Temperaturen während der Prozessführung im physiologischen Bereich liegen.^[67]

3.14. Übersicht über die verwendeten Geräte

Die nachfolgend aufgeführten Geräte sind für die Untersuchungen verwendet worden:

Analysenwaage	Sartorius, LA 310 s
Autoklav	Apparatebau Haage
Bohrer	HSS-Spiralbohrer, Hochleistungsschnellschnittstahl
DSC-Kalorimeter	Netzsch, DSC 204
Elementaranalysator	CE Instruments EA 1110
EDX	Ametek EDAX Genesis Serie ISIS EDX System, Oxford Instruments
ATR-Spektroskop	Bruker, Alpha
Materialprüfmaschine	Zwick, Universalprüfmaschine Modell 1488
Mühle	IKA-Werke, A11 basic
Nanosizer (DLS, Zeta-Potential)	Malvern Zetasizer Nano ZS ZEN 3600
pH-Meter	Hannah Instruments HI 991001
REM	FEI Quanta 400 FEG
Reinstwasser-Aufbereitungssystem	Elga Purelab Ultra Bioscience
Röntgendiffraktometer	Bruker D8 Advance
Scheibenzentrifuge	CPS Instr. Disc Centrifuge DC 24000
TEM	Philips CM 200 FEG
Thermowaage	Netzsch, STA 409 PC
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 510

Ultrazentrifuge	Thermo Electron Corporation Sorvall WX Ultra Series
Ultrazentrifugenrotor:	Type 70 Ti
UV-Vis-Spektrometer	Varian Cary 300 Bio Varian Cary 1 Bio
Vortexer	Scientific Industries, Vortex-Genie 2

3.15. Übersicht der verwendeten Chemikalien und Materialien

Aceton	p. a., Acros Organics
Calciumcarbonat	Merck
3-(trihydroxysilyl)-1-propanesulphonic acid	ABCR
Dialyseschlauch	Pierce, SnakeSkin 10K MWCO
Dichlormethan	Acros
Dowex [®] HCR-W2 ionexchange resin	Sigma-Aldrich
Ethanol	absolut, Riedel de-Haën
FITC-BSA	Sigma-Aldrich
Gentamycinsulfat	Fuzhou Antibiotic Group Corp.
HCl-Lösung 0,1 mol L ⁻¹	AppliChem
Isopropanol	p.a., VWR
Ludox [®] HS-30	Sigma-Aldrich
NaOH-Lösung 0,1 mol L ⁻¹	AppliChem
Natriumchlorid	VWR und Grüssing
Methylenblau	Fluka
o-Phtaldialdehyd Reagenz-Lösung	Sigma-Aldrich
PBS	Ruhr-Universität Bochum
Polylactid	Boehringer Ingelheim, R208 Sample MD
Polyvinylalkoholfäden	Kuraray Europe
Reinstwasser	Reinstwassergenerator Elga Purelab Ultra Bioscience
Schaefer PCC [®] -Kompositmaterialien	Schaefer Kalk
Saccharose	AppliChem
TRITC-BSA	Sigma-Aldrich

4. Experimenteller Teil

4.1. Kompositmaterialien

4.1.1. Synthese der lösemittelbasierten Kompositmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kompositmaterialien wurden von der Firma Schaefer Kalk geliefert. Zum Vergleich damit wurde ein Kompositmaterial herangezogen, welches auf einem lösemittelbasierten Herstellungsverfahren beruht. Dieses Kompositmaterial wurde von SCHILLER im Arbeitskreis von Prof. M. EPPLER entwickelt.^[57] In der vorliegenden Arbeit wird es mit dem Synonym „UniDuE“ bezeichnet.

In 100 mL Dichlormethan werden 2 g Polylactid (PDLLA) durch Rühren bei Raumtemperatur gelöst. Nach dem vollständigen Lösen werden 0,5 g Calciumcarbonat (Calcit) in pulverisierter Form hinzugegeben und unter weiterem kräftigem Rühren suspendiert. Anschließend wird die Suspension schnell in einen PFA-Rundkolben mit 300 mL Ethanol eingegossen. Hierdurch wird das Polymer ausgefällt und das Calciumcarbonat gleichmäßig im Material fixiert. Das Gemisch aus Ethanol und Dichlormethan wird bei 45 °C Badtemperatur an einem Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert. Der dabei entstandene Rückstand ist von gummiartiger Konsistenz und muss mechanisch mit einer Schere in kleine Stücke zerteilt werden. Die Stücke werden jetzt bei Raumtemperatur für eine Stunde im Ölpumpenvakuum getrocknet und danach in einer Mühle mit rotierenden Messern zu einer pulvrigen Konsistenz gemahlen. Anschließend wird das Material weitere fünf Stunden im Ölpumpenvakuum bei 70 °C getrocknet. Im letzten Schritt wird das Material noch einmal fein gemahlen und ist danach bereit für die weitere Verarbeitung.

4.1.2. Begasung der Kompositmaterialien in PTFE-Hohlformen

Die Kompositmaterialien werden im Autoklaven in rechteckigen PTFE-Hohlformen zu Formkörpern aufgeschäumt. Um Formkörper mit einer theoretischen Porosität von 50 % zu erhalten, wird die benötigte Materialeinwaage aus der Dichte der Materialien und dem Volumen der Form berechnet. Hierzu werden die Dichten der einzelnen Komponenten benötigt. PDLLA hat eine Dichte von $1,218 \text{ g cm}^{-3}$ und Calcit eine Dichte von $2,71 \text{ g cm}^{-3}$. Für das Kompositmaterial 80:20 (PDLLA:Calcit) ergibt sich somit eine Dichte von $1,37 \text{ g cm}^{-3}$, für das Kompositmaterial 75:25 eine Dichte von $1,41 \text{ g cm}^{-3}$ und für das Kompositmaterial 85:15 eine Dichte von $1,33 \text{ g cm}^{-3}$. Somit

ergeben sich mathematisch folgende Materialeinwaagen für eine Form mit den Innenmaßen von $90\text{ mm} \cdot 8\text{ mm} \cdot 4\text{ mm}$: 1,97 g für das Kompositmaterial 80:20, 2,03 g für das 75:25 Kompositmaterial und 1,91 g für das 85:15 Kompositmaterial. Das über das lösemittelbasierte Herstellungsverfahren gewonnene Kompositmaterial entspricht in seiner Zusammensetzung dem Schaefer Kalk-Komposit 80:20 und hat somit ebenfalls eine Dichte von $1,37\text{ g cm}^{-3}$. Für die Begasung werden gasdurchlässige PTFE-Hohlformen verwendet, die sich in ihrer Art etabliert haben.^[57, 71, 72] Die Abbildung 15 zeigt die verwendeten Hohlformen.

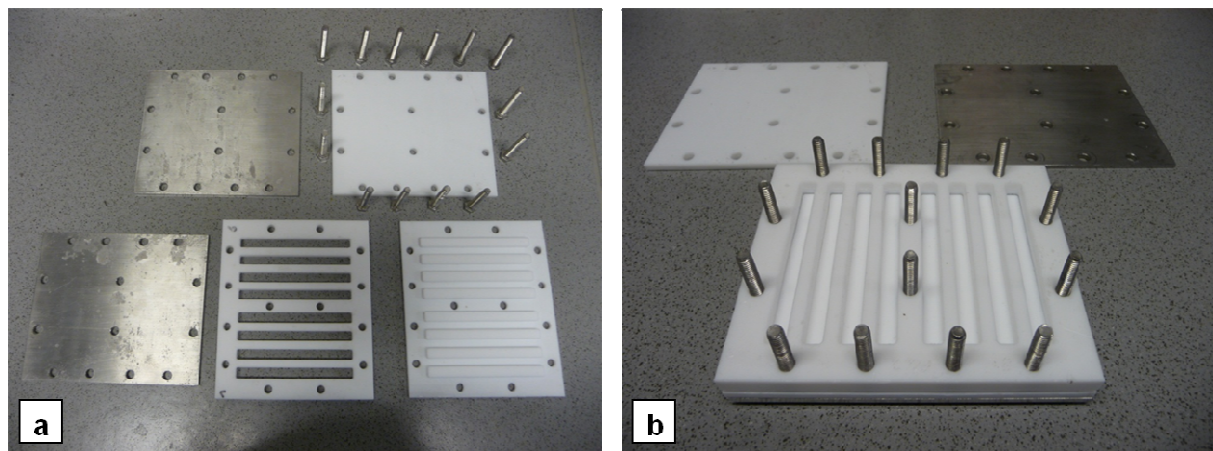


Abbildung 15: PTFE-Form zur Herstellung von rechteckigen Probekörpern mit den Maßen $90\text{ mm} \cdot 8\text{ mm} \cdot 4\text{ mm}$; a) Die Form besteht aus fünf einzelnen Elementen; b) Die Elemente werden nach dem Befüllen verschraubt und auf der Gegenseite durch Muttern fixiert.

Die PTFE-Hohlform wird auf ihrer Ober- und Unterseite durch Stahlplatten stabilisiert. Die befüllten und verschraubten Formen werden im Autoklaven bei 37 °C mit 100 bar CO_2 -Druck für zwei Stunden begast. Diese Prozessparameter haben sich zum Begasen als geeignet herausgestellt.^[57] Die Zeit von zwei Stunden gewährleistet die Diffusion des Kohlenstoffdioxids durch die PTFE-Form in die gesamte Probe. Somit ist gewährleistet, dass sich ein Gasabsorptionsgleichgewicht einstellen kann und kein Gaskonzentrationsgradient im Material entsteht. Anschließend wird der Druck innerhalb von 20 Minuten mit einer Dekompressionsrate von 5 bar min^{-1} auf Umgebungsdruck entspannt. Die Form wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck ruhen gelassen, um ein Nachschäumen des Materials beim Öffnen der Form zu verhindern. Danach können die fertigen Probekörper aus der Form

entnommen werden. Für die Dreipunktbiegeversuche werden die Probenkörper noch auf 80 mm Länge gekürzt, damit sie der DIN-Norm entsprechen.^[62]

4.2. Adsorptionsexperimente

4.2.1. Synthese oberflächenfunktionalisierter Siliciumdioxid-Nanopartikel

Für die Synthese wurden 18 nm große Siliciumdioxid-Nanopartikel von Sigma-Aldrich verwendet (Ludox[®] HS-30). Hierbei handelt es sich um kolloidale Partikel, die mit 30 Massenprozent in Wasser suspendiert sind. Die Oberflächenfunktionalisierung wurde nach der Methode von RODRIGUEZ durchgeführt.^[147] Durch diese Funktionalisierung tragen die Siliciumdioxid-Nanopartikel Sulfonsäuregruppen auf ihrer Oberfläche.

In einem Rundkolben werden 3 g Ludox[®] HS-30 mit 22 mL Reinstwasser verdünnt und kräftig gerührt. Zur gleichen Zeit werden 4 g 3-(Trihydroxysilyl)-1-Propansulfonsäure (40 Gew.-%) in 20 mL Reinstwasser verdünnt. Unter kräftigem Rühren wird die Silica-Suspension nun langsam zu der Propansulfonsäurelösung zugetropft. Anschließend wird eine 1-molare Natriumhydroxidlösung langsam zugetropft, bis ein pH-Wert von ca. 5 erreicht ist. Das gesamte Reaktionsgemisch wird nun auf 70 °C erhitzt und für 24 Stunden weiter kräftig gerührt. Danach wird das Gemisch in einen Dialyseschlauch (10K MWCO) überführt und für 48 Stunden mit Wasser dialysiert, das Wasser wird dabei regelmäßig gewechselt. Nicht reagierte Edukte werden somit größtenteils entfernt.

Anschließend können die funktionalisierten Partikel durch eine Ionenaustauschersäule geschickt werden, um alle Natriumionen zu entfernen und die auf der Oberfläche vorhandenen Sulfonsäuregruppen vollständig zu protonieren. Hierzu wird eine hohe Glasfritte mit einem Ionenaustauscherharz gefüllt und die Partikel durch die Säule geleitet.

4.2.2. Adsorption von Methylenblau, FITC-BSA und TRITC-BSA

Die funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel werden für die Untersuchung der Wechselwirkung mit dem kationischen Molekül Methylenblau (MB), mit Fluoresceinisothiocyanat markiertem bovinem Serumalbumin (FITC-BSA) und mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat markiertem bovinem Serumalbumin (TRITC-BSA) verwendet. Nach der Synthese hat die Partikelsuspension einen pH-Wert von ca. 2 bis 3. Nun werden die Partikel in zwei Reihen aufgeteilt. Ein Teil der Adsorptionsexperimente wird bei diesem pH-Wert durchgeführt und ein anderer Teil

bei einem pH-Wert von 7. Hierzu wird die Dispersion mit 0,1 molarer Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 7 gebracht. Die Konzentrationen der Partikeldispersion wird über die eingewogene Masse und das Volumen nach der Synthese bestimmt. Die Volumina der Natriumhydroxidlösung werden hierbei entsprechend mit berücksichtigt. Die Konzentration der funktionalisierten Partikel liegt gewöhnlich im Bereich von ca. $12,6 \text{ mg mL}^{-1}$. Zur gleichen Zeit werden Stammlösungen von Methylenblau ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$), von FITC-BSA (1 mg mL^{-1}) und von TRITC-BSA (1 mg mL^{-1}) angesetzt. Für die entsprechenden Adsorptionsexperimente werden pro Adsorptiv jeweils eine Konzentrationsreihe bei einem pH-Wert von 2 und eine Konzentrationsreihe bei einem pH-Wert von 7 erstellt. Hierzu werden ultrazentrifugenbeständige Mikroreaktionsgefäße (Eppendorf-Reaktionsgefäße) verwendet, die ein Fassungsvermögen von 1,5 mL aufweisen. Die Proben werden entsprechend ihres pH-Wertes mit pH-justiertem Wasser verdünnt. Zunächst werden die Ausgangskonzentrationen von Partikeln und Adsorptiv in jeder Probe der Konzentrationsreihe ermittelt. Hieraus werden die Massenverhältnisse (Adsorptiv zu Partikel) ermittelt, um so einen Zusammenhang zwischen Adsorption und Massenverhältnis zu erhalten (vgl. Kap. 6.5). Die Konzentration der Partikel bei den Experimenten bei einem pH-Wert von 2 liegt so in jedem Ansatz zwischen etwa $0,1$ und $9,2 \text{ mg mL}^{-1}$ und bei den Experimenten bei einem pH-Wert von 7 zwischen etwa $0,1$ und $12,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Die Konzentrationen der Adsorptive liegen bei den Experimenten mit einem pH-Wert von 2 bei $22,7 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ für MB, bei $90,9 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ für FITC-BSA und bei $90,9 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ für TRITC-BSA. Die Konzentrationen der Adsorptive liegen bei den Experimenten mit einem pH-Wert von 7 zwischen $0,1$ und $125,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ für MB, zwischen $5,0$ und $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ für FITC-BSA und zwischen $5,1$ und $515 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ für TRITC-BSA. Nachdem die Partikeldispersionen mit den entsprechenden Adsorptivlösungen vermischt und durch einen Vortexer homogenisiert wurden, wird nun jeder einzelne Ansatz für 24 Stunden bei Raumtemperatur äquilibriert. Hierdurch soll gewährleistet werden, dass sich ein Adsorptionsgleichgewicht einstellen kann. Anschließend werden die Proben 30 Minuten bei 30000 U min^{-1} zentrifugiert. Der Überstand wird mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Durch Kalibration der entsprechenden Adsorptive kann aus der Differenz der theoretischen und der gemessenen Konzentration der Adsorptionsgrad bestimmt werden.

5. Ergebnisse und Diskussion – Kompositmaterialien

5.1. Konzept

Der Anfertigung und Konstruktion von Implantatmaterialien kommt eine besondere Bedeutung zu, da viele Fragestellungen im interdisziplinären Kontext beantwortet werden müssen. Im Bereich des Gesichtsschädels kommt es aufgrund von Verletzungen, Unfällen, Fehlbildungen sowie ablativer Tumorchirurgie zu einem Bedarf an Knochenersatzmaterialien, da nicht immer autogener Knochen verwendet werden kann.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse sind im Rahmen eines BMBF-Projektes entstanden. Ziel dieses Projektes war die Entwicklung osteogen wirksamer, resorbierbarer Implantate zur knöchernen Rekonstruktion im Bereich des Gesichtsschädels. Die Projektpartner kamen aus dem universitären Umfeld sowie aus der Industrie. Die mechanischen Messungen, Projektdokumentationen und Materialverarbeitungen sind in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. THOMAS ANNEN (Universität Duisburg-Essen) durchgeführt worden. Die Ergebnisse sind in die interne Projektdokumentation eingegangen und in Form von Berichten fixiert worden. Abbildung 16 zeigt schematisch die knöcherne Rekonstruktion am Schädel durch ein poröses, polymeres Implantat.

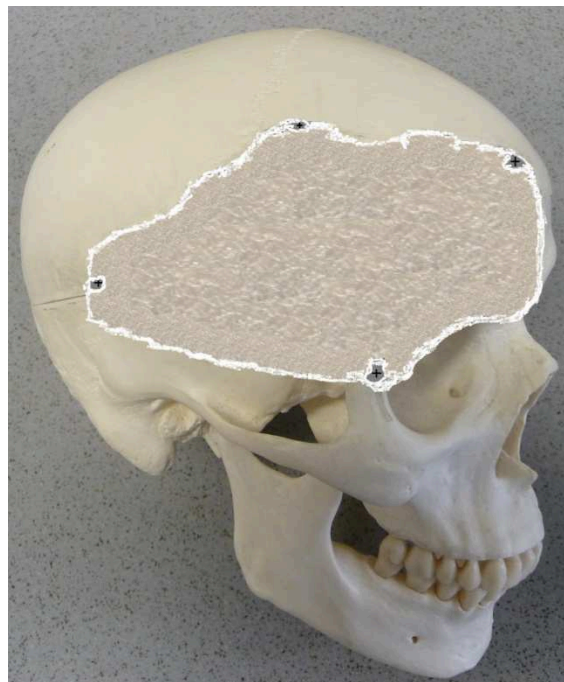


Abbildung 16: Schematische Darstellung eines aufgeschnittenen porösen, polymeren Implantates am humanen Schädel.

Im Rahmen des gesamten Verbundprojektes wurden folgende Ziele angestrebt: Die Implantate sollen aus bioresorbierbaren Polymeren und in Gestalt von individuellen Formkörpern produziert werden. Um eine individuelle geometrischen Form zu produzieren, sollen in Zukunft computertomographische Datensätze herangezogen werden. Die Implantate sollen nicht nur die Versorgung von Defekten sicher stellen, sondern auch die Regeneration des körpereigenen Knochens fördern und die Osteogenese aktiv anregen.

Durch die Begasung der polymeren Kompositmaterialien in PTFE-Hohlformen mit überkritischem Kohlenstoffdioxid werden poröse Implantatkörper hergestellt. Wachstumsfaktoren zur Stimulierung der Osteogenese können durch den Begasungsprozess in das Material inkorporiert werden. Die Prozesstemperatur von 37 °C gewährleistet die Stabilität der Proteine und verhindert deren Denaturierung. Nach der Implantation der Materialien sollen die inkorporierten Wirkstoffe eine kontinuierlichen Freisetzung bewirken. Neben der Geometrie spielen auch die mechanischen Eigenschaften des Implantates eine entscheidende Rolle.

Um die Osteogenese zu induzieren, kommen *bone morphogenetic proteins* (BMPs) in Betracht.^[39, 42, 44] Von SCHLIEPHAKE *et al.* wurde die Freisetzungskinetik von rhBMP-2 aus aufgeschäumten Formkörpern untersucht.^[36] Neben der Knochenneubildung ist auch die Angiogenese (Neubildung von Blutgefäßen) von Interesse. Ein entsprechendes Signalprotein ist hier der *vascular endothelial growth factor* (VEGF).^[254] Neben der mechanischen Stabilität sollten Implantatmaterialien auch eine kontrollierte Freisetzung etwaiger inkorporierter Wirkstoffe wie den erwähnten BMPs und VEGF ermöglichen. Als Knochenersatzmaterial bietet sich ein Komposit aus Poly-(D,L-Lactid) und Calcit an. Die Zusammensetzung im Verhältnis 4:1 von PDLLA zu Calciumcarbonat wurde von SCHILLER optimiert und gewährleistet die pH-Stabilität im Verlauf der Degradation des Materials.^[57] Da bei der Degradation Milchsäuremonomere frei werden, kann es in der Peripherie des Implantates zu inflammatorischen Reaktionen des Gewebes kommen. Zur Abpufferung der sauren Monomere können Calciumcarbonat oder Calciumphosphat eingesetzt werden, indem sie als Füllstoff mit dem Polymer aufgeschäumt werden.^[58] Das Kompositmaterial hat sich im biologischen Kontext (Zellkulturexperimente und Tierversuche) als geeignet erwiesen.^[255] Von ANNEN wurde auch die Darstellung von hierarchisch porösen Schäumen aus diesem Kompositmaterial beschrieben.^[71] Die mechanischen Eigenschaften des Materials konnten in vorherigen Untersuchungen

studiert werden, in denen sich das Material als geeignetes System erwiesen hat.^[71, 72] Im Arbeitskreis von Prof. MATTHIAS EPPLE liegt ein besonderer Schwerpunkt auf der Entwicklung von Biomaterialien. Im Verlauf der letzten Jahre konnten einige Konzepte zum Knochenersatz, auch durch externe Kooperationen, entwickelt werden. Dazu zählt beispielsweise die Entwicklung individueller Implantatkonzepte für den Schädelknochen.^[60, 66]

Ein grundsätzliches Problem ergibt sich bei der Übertragung von Laborergebnissen in die klinische Anwendung. Für die Zulassung von Medizinprodukten müssen strenge Hürden genommen werden, es werden besondere Anforderungen an die Produktsicherheit gestellt. Da die Kompositmaterialien durch ein lösemittelbasiertes Herstellungsverfahren synthetisiert werden, können Lösemittelrückstände im Material nie ganz ausgeschlossen werden. Für die Zulassung eines Produktes können sich somit potentiell Probleme rechtlicher Art ergeben. Deshalb war es notwendig, den Prozess der Materialherstellung dahin gehend zu optimieren, Lösemittel gänzlich aus dem Prozess zu verbannen. Hierzu muss das Polymer mit dem Calciumcarbonat mechanisch compoundiert werden. Da dies ohne geeignetes *Know-how* und der apparativen Ausstattung nicht ohne Weiteres möglich ist, wurde in dem Unternehmen Schaefer Kalk GmbH & Co. KG ein Kooperationspartner für die Herstellung eines Kompositmaterials gefunden. Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit dem Unternehmen Karl Leibinger Medizintechnik GmbH & Co. KG unterschiedliche Kompositmaterialien geliefert und in der vorliegenden Arbeit untersucht. Da es sich bei diesem Material um ein „neues“ System handelt, müssen sämtliche Parameter erfasst und mit dem konventionellen Kompositmaterial abgeglichen werden – insbesondere die pH-Stabilität, das Degradationsverhalten, die mechanischen Eigenschaften und die strukturellen Parameter, wie Porosität und Schäumungsverhalten beim Begasen.

5.2. Charakterisierung der Kompositmaterialien

5.2.1. Charakterisierung der keramischen Phase

Für die Untersuchungen wurden unterschiedliche Kompositmaterialien geliefert, die sich in ihrer chemischen Zusammensetzung hinsichtlich ihrer Calcitgehalte und in der Art der Calcitkristalle unterscheiden. Es handelt sich um Kompositmaterialien, einmal mit amorphen Calciumcarbonatpartikeln (ACC) und einmal mit gefällten Calciumcarbonatpartikeln (PCC, engl. *precipitated calcium carbonate*) in zwei unterschiedlichen Partikelgrößen. Als Polymer ist in jedem Komposit amorphes PDLLA enthalten. Bei den zwei Partikelgrößen handelt es sich einmal um 7 μm große Partikel (PCC-7) und einmal um Calciumcarbonatpartikel mit einer Größe von 12 μm (PCC-12). Darüber hinaus wurden noch drei Kompositmaterialien mit definierten Massenverhältnissen geliefert. Der Calcitgehalt wurde in diesen Kompositen systematisch erhöht und beläuft sich theoretisch auf jeweils 15 %, 20 % und 25 %. Diese Komposite werden im weiteren Verlauf mit 85:15, 80:20 und 75:25 bezeichnet. Die keramische Phase besteht bei allen drei Kompositen ebenfalls aus PCC-12-Partikeln. Dabei sollte die Zusammensetzung des 80:20-Komposits dem konventionellen Material (4:1) entsprechen. Zur Charakterisierung der keramischen Phase des Komposits wurden die Calcitkristalle mittels Rasterelektronenmikroskopie auf ihre Morphologie und Größe hin untersucht. Abbildung 17 zeigt amorphe Calciumcarbonatpartikel mit einer Größe von ca. 1 μm bei a) 40000-facher Vergrößerung und b) 2500-facher Vergrößerung.

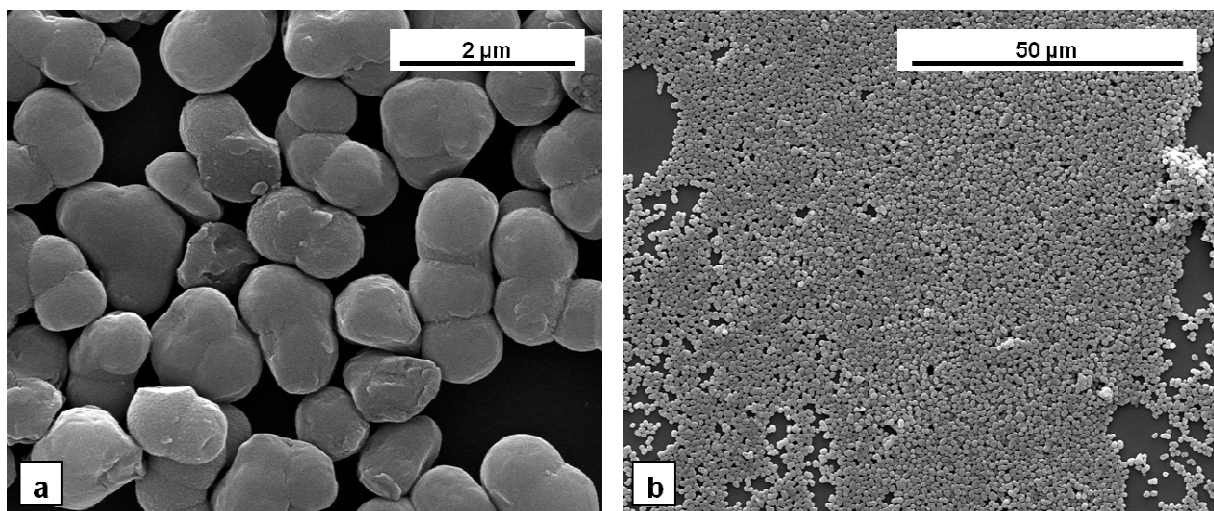


Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von amorphen Calciumcarbonatpartikeln des ACC-Komposits.

Die einzelnen Partikel weisen eine unregelmäßige Gestalt auf. Abbildung 18 zeigt die PCC-7-Partikel bei a) 600-facher Vergrößerung und b) 2500-facher Vergrößerung.

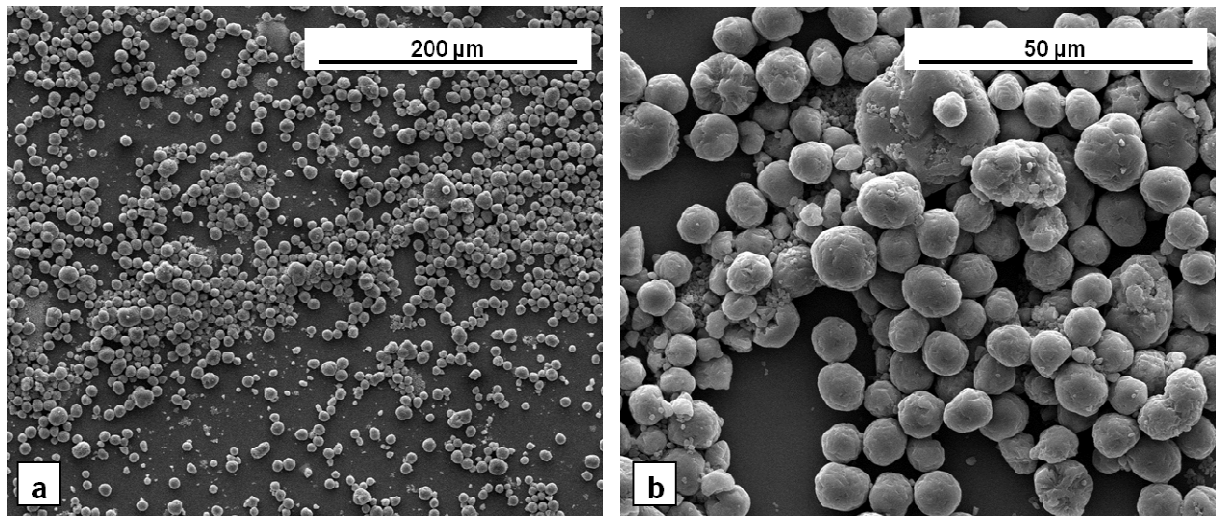


Abbildung 18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der 7 µm großen Calcitpartikel (PCC-7).

Abbildung 19 zeigt die PCC-7-Partikel bei einer noch höheren Auflösung bei a) 10000-facher Vergrößerung und b) 20000-facher Vergrößerung.

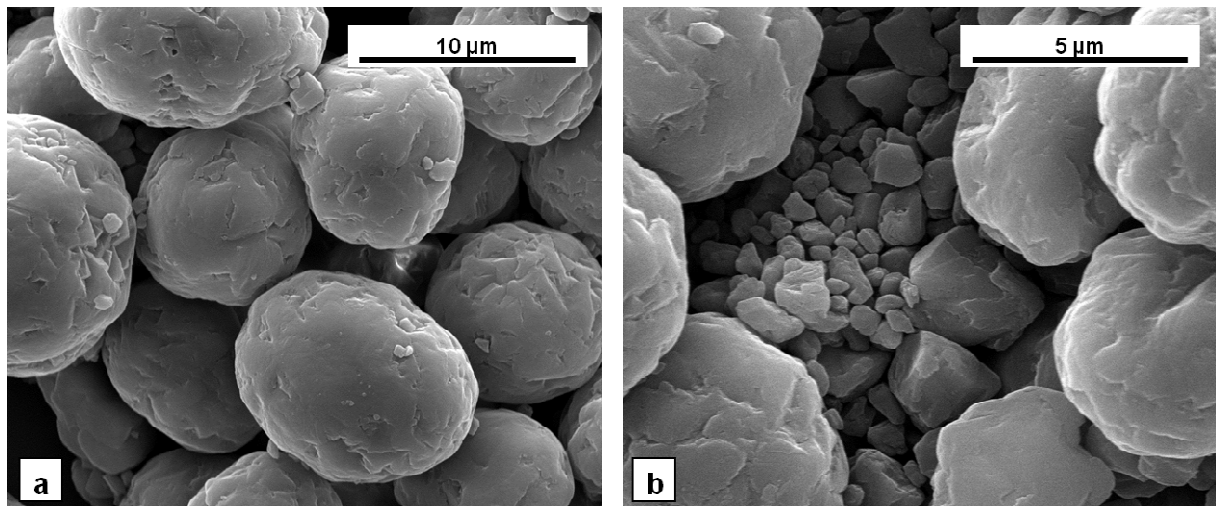


Abbildung 19: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der 7 µm großen Calcitpartikel (PCC-7).

Zum Vergleich zeigt Abbildung 20 PCC-12-Partikel bei a) 2500-facher Vergrößerung und b) 10000-facher Vergrößerung.

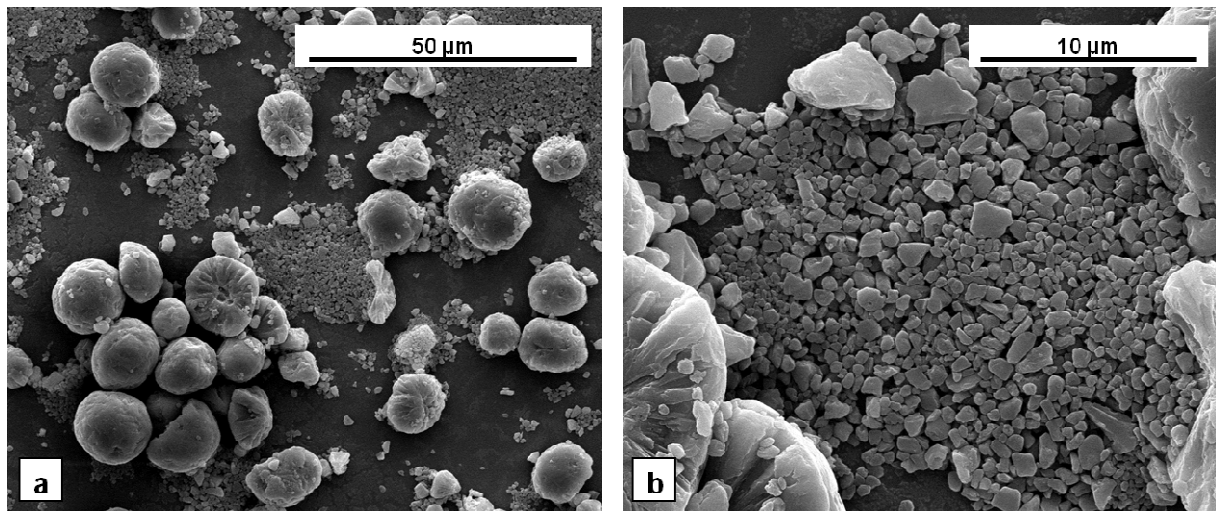


Abbildung 20: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der 12 µm großen Calcitpartikel (PCC-12).

Abbildung 21 zeigt die PCC-12-Partikel bei a) 10000-facher Vergrößerung und einer noch höheren Auflösung, b) mit 40000-facher Vergrößerung.

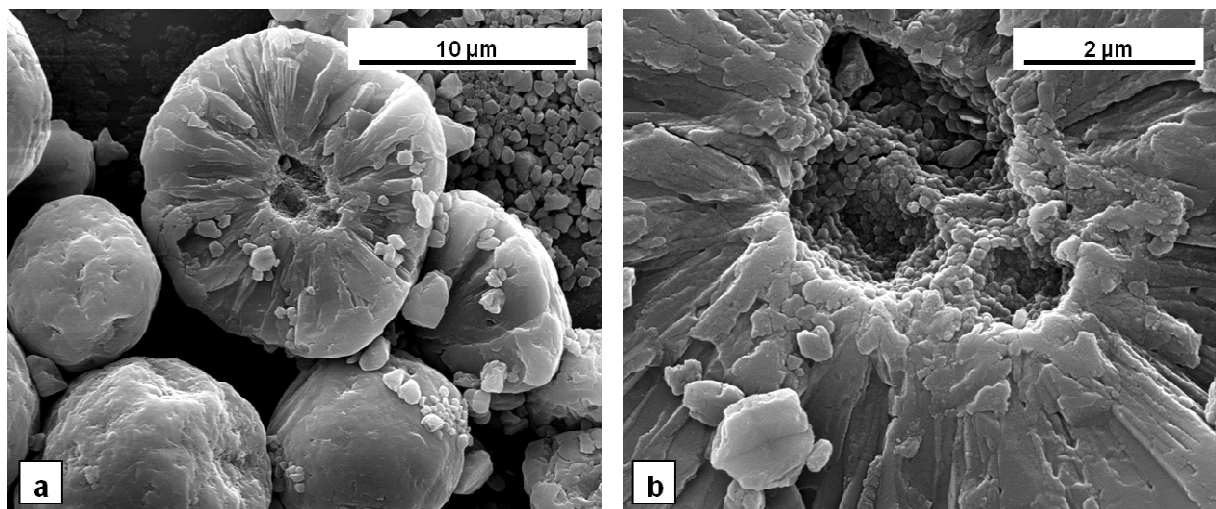


Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der 12 µm großen Calcitpartikel (PCC-12).

Besonders auffällig ist die für Calcit ungewöhnliche sphärische Morphologie der Partikel. Dabei sind die einzelnen mikrometergroßen Partikel aus vielen submikrometergroßen Kristalliten zusammengesetzt. In Abbildung 20 und 21 sind noch weitere kleine Bruchstücke zu sehen, die neben den einzelnen Partikeln liegen und eine unregelmäßige Gestalt aufweisen. An dieser Stelle stellt sich die Frage,

inwieweit die Partikelmorphologie den Schäumungsprozess der Komposite im weiteren Verlauf beeinflussen wird, denn bei der Dekompression diffundiert das Kohlenstoffdioxid entlang der Grenzflächen der Calcitkristalle aus dem Formkörper hinaus. Zum Vergleich gezeigt: Calciumcarbonatpartikel des selbst synthetisierten und bewährten UniDuE-Kompositmaterials nach SCHILLER in Abbildung 22 von a) 2500-facher und b) 10000-facher Vergrößerung.

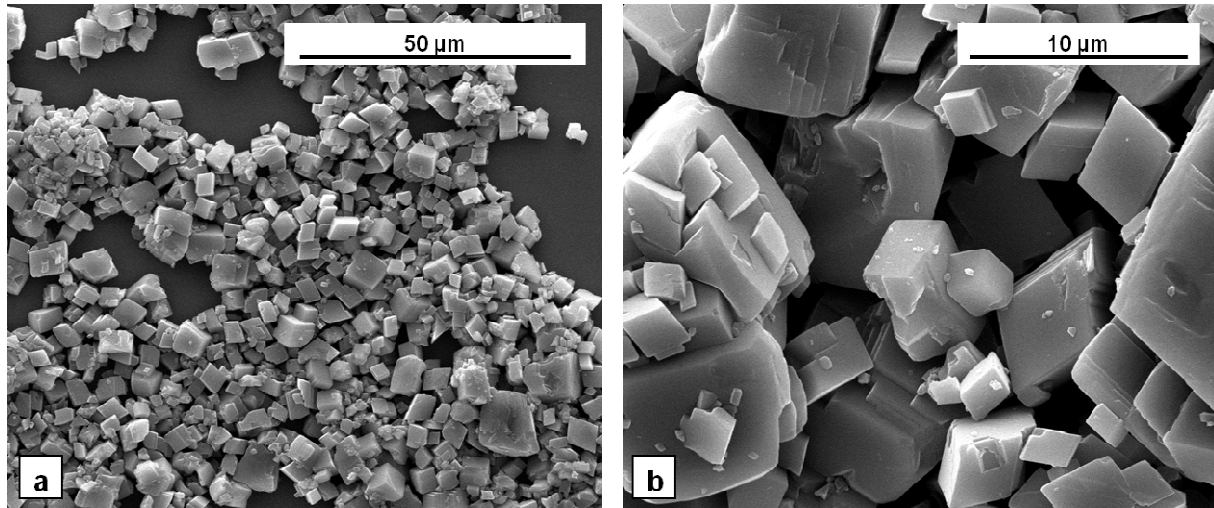


Abbildung 22: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der herkömmlichen Calcitkristalle wie sie im traditionellen Kompositmaterial vorkommen.

Die Morphologie der Partikel wirkt hier deutlich kantiger als die der PCC-Partikel und hat eher die Gestalt eines Quaders. Im Fall der beiden PCC-Komposite handelt es sich, wie im Diffraktogramm in Abbildung 23 zu erkennen ist, beim vorliegenden Calciumcarbonat tatsächlich um Calcit. Das Diffraktogramm des ACC-Komposits zeigt das Vorhandensein von amorphem Calciumcarbonat.

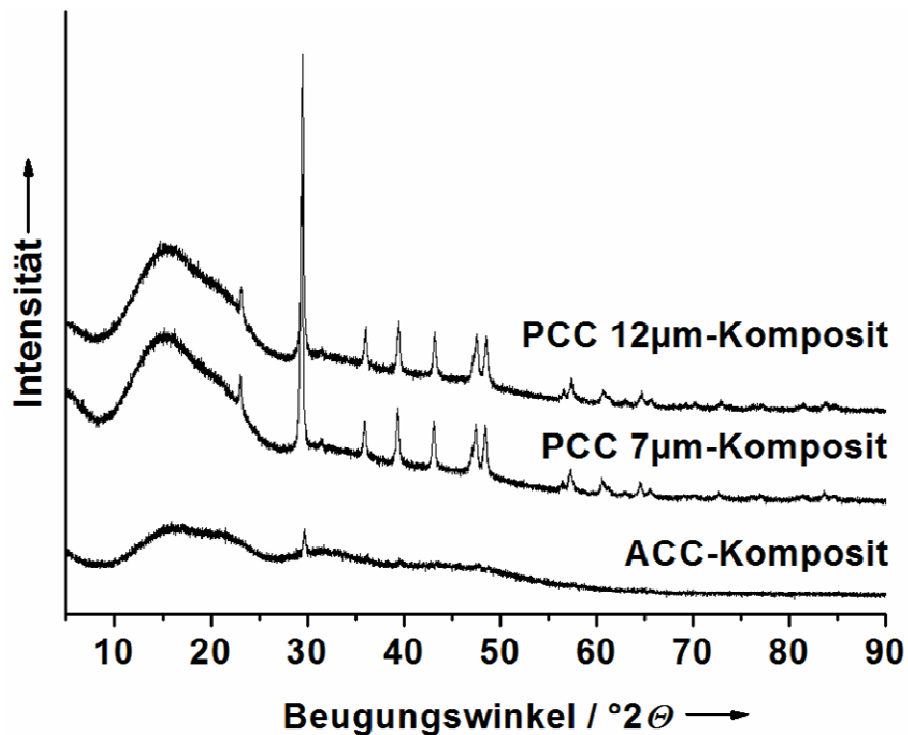


Abbildung 23: Diffraktogramm der unterschiedlichen Kompositmaterialien.

5.2.2. Charakterisierung der Kompositmaterialien

Betrachtet man die fertigen Kompositmaterialien nach ihrer Synthese, so sind die makroskopischen Unterschiede gering. Die Korngrößen der gemahlene Komposite sind dabei vergleichbar und liegen im Bereich von ca. 1 bis 2 mm. Es wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Kompositmaterialien angefertigt. Abbildung 24 zeigt die Körner des ungeschäumten Kompositmaterials a) des ACC-Komposits bei 70-facher Vergrößerung und b) des UniDuE-Komposits bei 70-facher Vergrößerung.

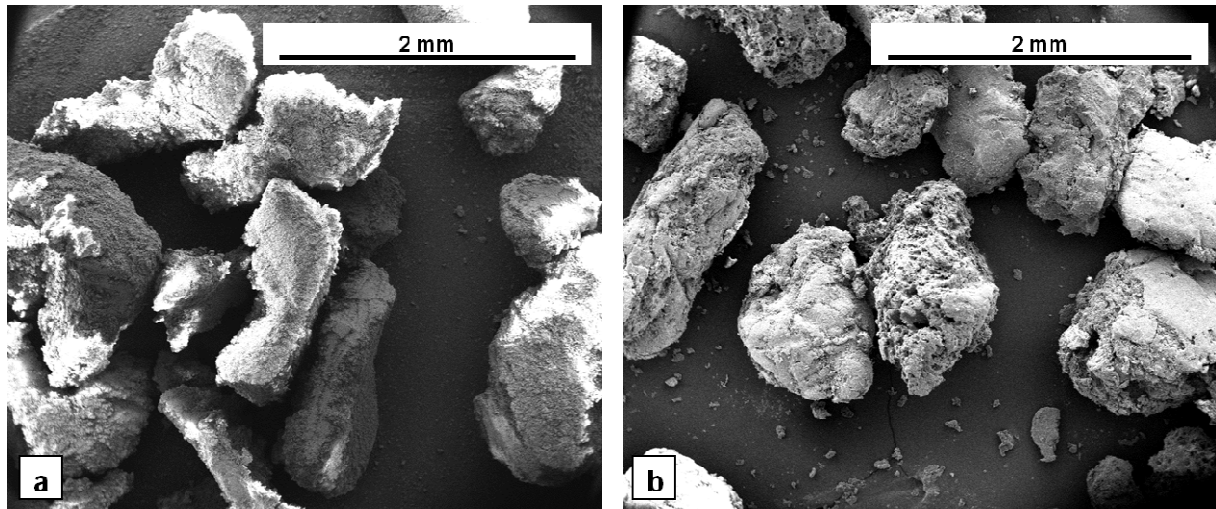


Abbildung 24: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Kompositkörner: a) ACC-Komposit und b) UniDuE-Komposit.

Abbildung 25 zeigt die Körner des ungeschäumten Kompositmaterials bei a) des PCC-7-Komposits bei 69-facher Vergrößerung und b) des UniDuE-Komposits bei 69-facher Vergrößerung.

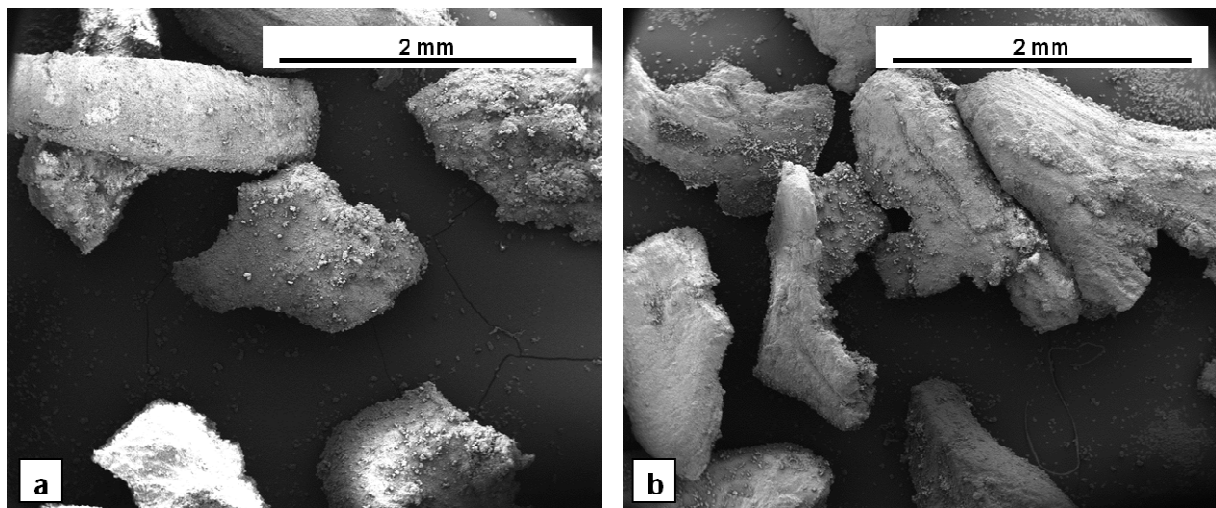


Abbildung 25: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Kompositkörner: a) PCC-7-Komposit und b) PCC-12-Komposit.

Bei höherer Auflösung sind größere Unterschiede bei den einzelnen Kompositmaterialien zu erkennen. Abbildung 26 zeigt ungeschäumtes Kompositmaterial von a) ACC-Komposit bei 5000-facher Vergrößerung und b) des UniDuE-Komposits bei 5000-facher Vergrößerung.

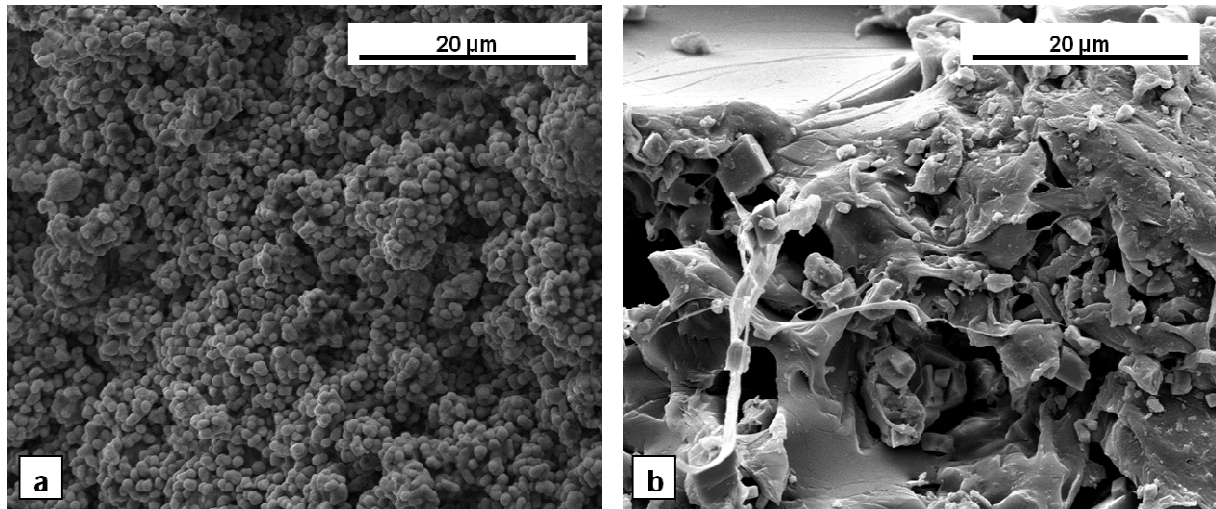


Abbildung 26: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des ungeschäumten Kompositmaterials; a) ACC-Komposit und b) UniDuE-Komposit.

Im ACC-Komposit sind die amorphen Calcitpartikel homogen verteilt, außerdem besitzt das Material eine sehr große Oberfläche. Im UniDuE-Komposit zeigt sich ebenfalls eine annähernd homogene Verteilung der Calcitkristalle, die auf der Polymermatrix aufliegen. Es ist bereits eine gewisse Porosität im Granulat zu erkennen. Abbildung 27 zeigt ungeschäumtes Kompositmaterial von a) PCC-7-Komposit bei 5000-facher Vergrößerung und b) des PCC-12-Komposits bei 5000-facher Vergrößerung.

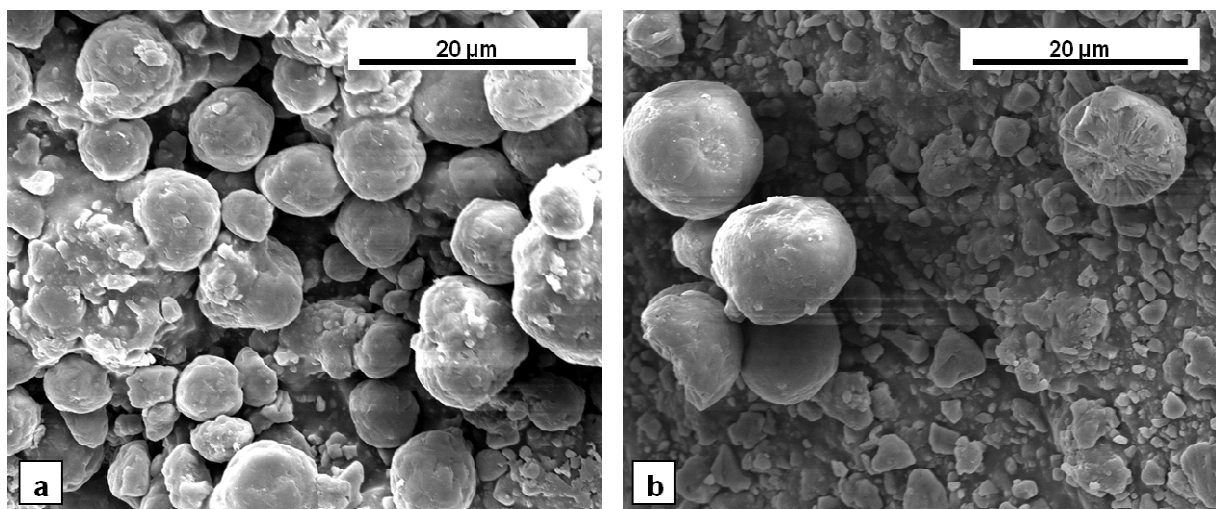


Abbildung 27: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des ungeschäumten Kompositmaterials; a) PCC-7-Komposit und b) PCC-12-Komposit.

Die Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der beiden PCC-Komposite zeigen die sphärischen Calcitkristalle, die auf dem Polymer aufliegen. Die Polymermatrix scheint bei diesen Kompositmaterialien wesentlich kompakter zu sein, des Weiteren ist keine Porosität im Ausgangsgranulat zu erkennen.

Um die Polymerkomponente des Kompositmaterials spektroskopisch zu untersuchen, wurde ein IR-Spektrum des Komposits im Verhältnis 80:20 als Pulver aufgenommen. Die Probe wurde nach der ATR-Methode (abgeschwächte Totalreflexion) vermessen.

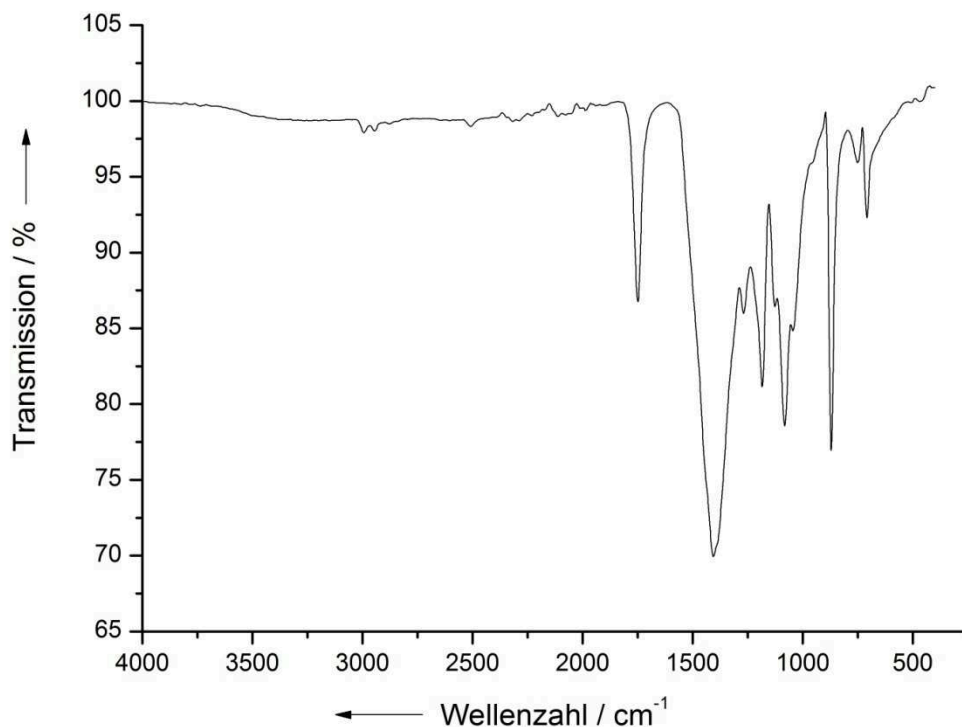


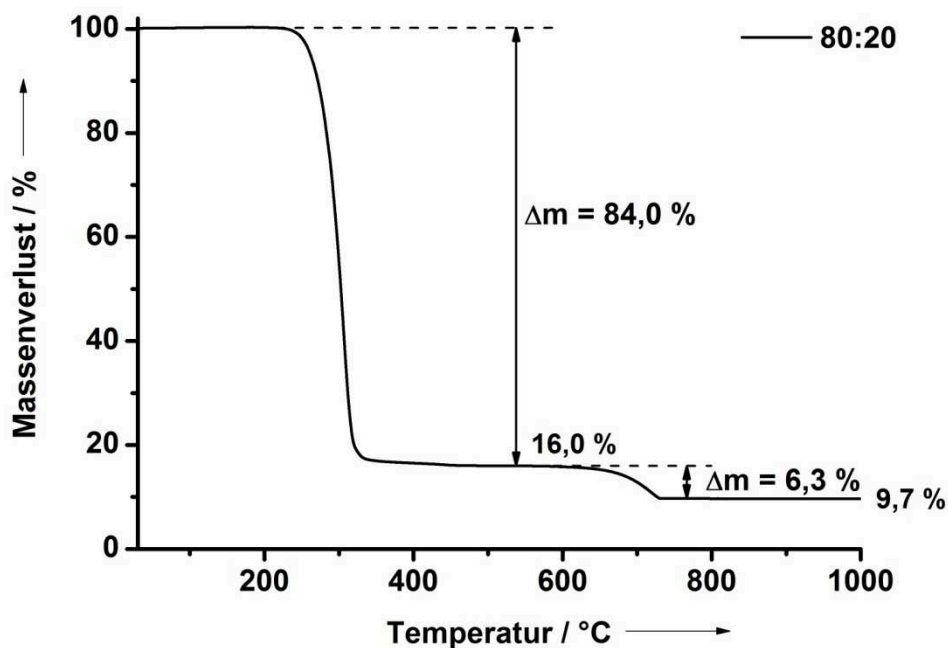
Abbildung 28: IR-Spektrum des 80:20-Komposits nach der ATR-Methode.

Die wichtigsten charakteristischen Banden sind in Tabelle 3 dargestellt und den vorhandenen funktionellen Gruppen zugeordnet.

Tabelle 3: Zuordnung der Wellenzahlen des IR-Spektrums vom 80:20-Kompositmaterial.

Zuordnung	Wellenzahl in cm^{-1}
CH, CH_3	2994
C=O	1749
CH, CH_3	1406
C-O	1082-1184

Beim mechanischen Compoundierungsprozess des Kompositmaterials entstehen Pulver, die aus verfahrenstechnischen Gründen vermutlich eine geringere Homogenität als die lösemittelbasierten Komposite aufweisen. Die drei Kompositmaterialien mit den theoretischen Calcitgehalten von jeweils 15 %, 20 % und 25 % wurden daher hinsichtlich ihrer Zusammensetzung mittels TG-Analysen untersucht. Abbildung 29 zeigt ein repräsentatives TG-Diagramm des 80:20-Komposits. Die erste Stufe von 84,0 % entspricht der Verbrennung des PDLLA, während die verbleibende Restmasse von 16,0 % dem Calcitgehalt entspricht. Der erneute Massenverlust in einem Temperaturbereich von ca. 700 °C entspricht der Zersetzung des Calcits zu Calciumoxid und kann die Messungen verifizieren.

**Abbildung 29:** Repräsentative thermogravimetrische Messung des 80:20-Komposits von Schaefer Kalk.

Jedes der drei Kompositmaterialien wurde einer Dreifachbestimmung unterzogen, die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Thermogravimetrische Ergebnisse einer Dreifachbestimmung der Massenanteile von PDLLA und Calcit in den Kompositmaterialien von Schaefer Kalk.

Komposit-Material	Messung	$\Delta m_{(1.Stufe)}$	$\Delta m_{(2.Stufe)}$	$m_{(CaCO_3)}$	$m_{(CaO)}$	$\frac{m_{(CaCO_3)}}{m_{(CaO)}}$
		%	%	%	%	theoretisch 1,8
75:25	1	79,9	8,4	20,1	11,7	1,7
	2	79,4	8,4	20,6	12,2	1,7
	3	82,0	7,4	18,0	10,6	1,7
	M	80,4	8,1	19,6	11,5	1,7
80:20	1	84,0	6,3	16,0	9,7	1,6
	2	84,4	6,3	15,6	9,3	1,7
	3	85,7	6,0	14,3	8,3	1,7
	M	84,7	6,2	15,3	9,1	1,7
85:15	1	89,9	4,6	10,1	5,5	1,8
	2	87,1	4,8	12,9	8,1	1,6
	3	90,6	4,5	9,4	4,9	1,9
	M	89,2	4,6	10,8	6,2	1,8

Bei den Messungen zeigt sich, dass die Calcitgehalte der Kompositmaterialien sich von den theoretischen Nennwerten unterscheiden, sie sind um etwa 5 % niedriger. Somit ergeben sich mathematisch leichte Abweichungen bei den Parametern, wie der Dichte und der durch den Schäumungsprozess generierten Porosität. Tabelle 5 zeigt die durch thermogravimetrische Untersuchungen bestimmte Dichte und die Ist-Porosität der geschäumten Kompositmaterialien gegenüber den zuvor theoretisch ermittelten Werten.

Tabelle 5: Theoretische Berechnungen der Einwaageparameter gegenüber den experimentellen thermogravimetrischen Ergebnissen.

Massenanteile		Dichte	Volumen	Soll-	Ist-	Porosität
PDLLA	Calcit	Komposit	der Form	Einwaage	Einwaage	
%	%	g cm^{-3}	cm^3	g	g	
85	15	1,33	2,88	1,91		50
80	20	1,37		1,97		50
75	25	1,41		2,03		50
über TG korrigierte Werte						
90	10	1,29	2,88	1,86	1,91	49
85	15	1,33		1,91	1,97	49
80	20	1,37		1,97	2,03	48
Dichte	PDLLA	1,22	die theoretischen Dichten der Komposite werden über die Dichten des PDLLA und des Calcits berechnet			
	Calcit	2,71				

5.2.3. Charakterisierung der geschäumten Kompositmaterialien

Für die praktische Anwendung ist insbesondere das Schäumungsverhalten der Kompositmaterialien von großem Interesse. Zur qualitativen Beurteilung des Schäumungsverhaltens wurden die Formkörper sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch begutachtet. Im Rahmen des Projektes sollte ein Kompositmaterial für die Prozesskette der Implantatfertigung ausgewählt werden, welches den Anforderungen an ein Implantatmaterial am ehesten gerecht wird. Das Kompositmaterial mit amorphem Calciumcarbonat scheidet aufgrund des unzureichenden Schäumungsverhaltens aus, das durch den lösemittelbasierten Herstellungsprozess gewonnene UniDuE-Komposit weist hingegen erfahrungsgemäß ein gutes Schäumungsverhalten auf. Das ideale Kompositmaterial sollte daher ein vergleichbares Verhalten zeigen. Abbildung 30 und 31 zeigen das makroskopische Schäumungsverhalten der unterschiedlichen Kompositmaterialien. Sie sind repräsentativ für die Qualität aller geschäumten Formkörper. Neben den Formkörpern sind teilweise dünne Polylactidhäute zu erkennen, die durch den Begasungsprozess bedingt sind und vor der weiteren Verwendung der Formkörper mit einem feinen Schneidewerkzeug entfernt werden. Die abgebildeten Formkörper werden für die Dreipunktbiegeversuche sowie für die Degradationsversuche eingesetzt.

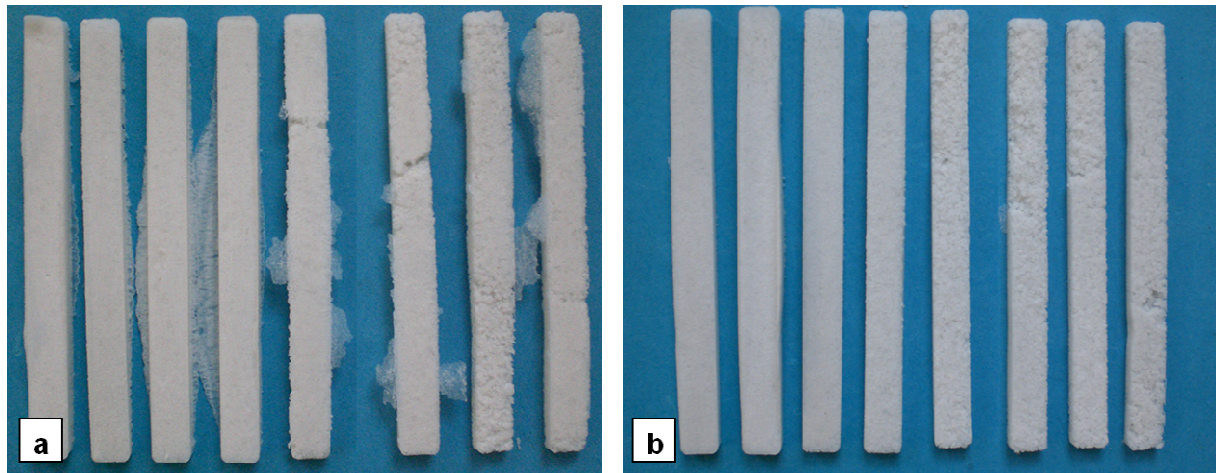


Abbildung 30: Qualitatives Schäumungsverhalten der Formkörper: a) des 75:25-Komposits und b) des 80:20-Komposits.



Abbildung 31: Qualitatives Schäumungsverhalten der Formkörper des 85:15-Komposits.

Das Schäumungsverhalten des PDLLA wird erheblich durch den Füllstoffgehalt, in diesem Falle durch das Calcit, beeinflusst. Die Integrität des Formkörpers sollte gewährleistet sein und die Form durch den Schäumungsprozess vollständig ausgefüllt werden. SCHILLER hat den Einfluss des Füllstoffgehalts auf das Aufschäumverhalten von PDLLA ausführlich untersucht.^[57] Tendenziell wird die Qualität der resultierenden Schäume umso schlechter, je höher der Füllstoffgehalt im Kompositmaterial ist. Entscheidend für den Schäumungsvorgang ist die Grenzfläche zwischen den Calciumcarbonatpartikeln und der Polymermatrix. Hier findet ein heterogener Nukleationsprozess der Blasenbildung bei der Dekompression des

Kohlenstoffdioxids statt.^[57] Dieser Prozess beeinflusst die Porosität und Schaumqualität des erhaltenen Formkörpers. Der zugesetzte Füllstoff verdünnt auch das Polymer, dieser Verdünnungseffekt beeinflusst ebenfalls das Schäumungsverhalten.^[57] Makroskopisch zeigt sich, dass die Homogenität der Formkörper mit steigendem Calcitgehalt abnimmt, was zum Ausschluss des 75:25-Komposits führte. Das 85:15-Komposit wurde ebenfalls ausgeschlossen, da zu Beginn des Projektes noch unklar war, inwieweit der geringe Calcitgehalt zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes während der Degradation geeignet ist. Das 80:20-Komposit wurde schließlich als zu bevorzugendes Material festgelegt. Abbildung 32 zeigt die mittels Rasterelektronenmikroskopie untersuchte Schaumstruktur des a) unzureichend aufgeschäumten ACC-Komposits bei 69-facher Vergrößerung und b) des UniDuE-Komposits bei 70-facher Vergrößerung.

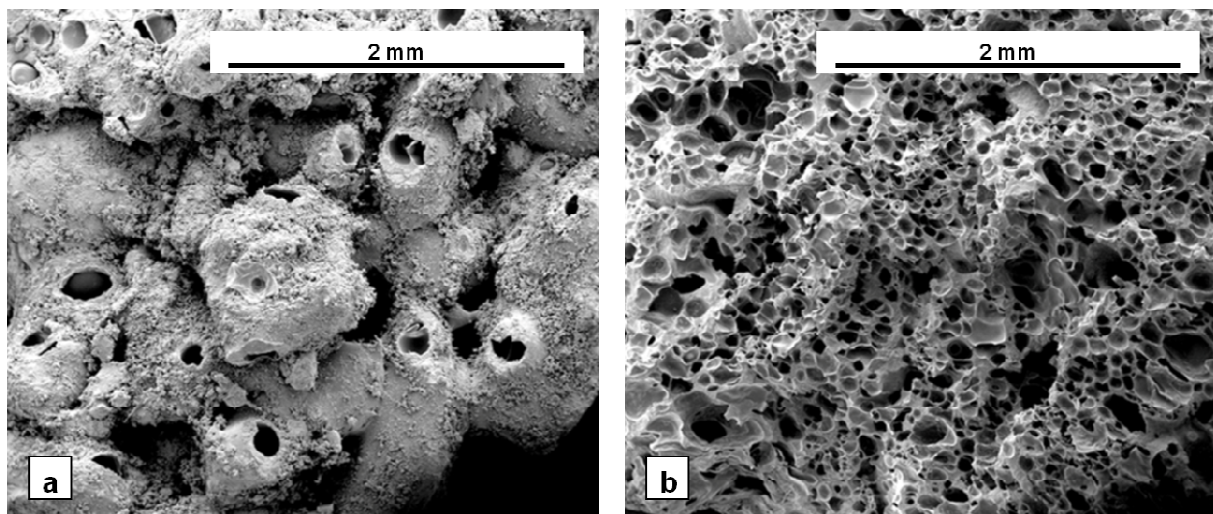


Abbildung 32: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Schaumstruktur: a) des ACC-Komposits und b) des UniDuE-Komposits.

Beim ACC-Komposit kommt es durch die Begasung zu keiner ausreichenden Porosität im Material. Im UniDuE-Komposit zeigt sich die bekannte homogene Schaumstruktur. Die einzelnen Poren haben einen Durchmesser von ungefähr 200 bis 400 μm . Diese Größe sollte das Einwachsen von Knochenzellen in das Material ermöglichen und daher ein osteokonduktives Potential aufweisen, dennoch handelt es sich hierbei nicht um ein interkonnektierendes Porensystem. Osteoblasten weisen eine Größe von ca. 20 μm auf, Osteozyten eine Größe zwischen 20 und 60 μm und Osteoklasten eine Größe von bis zu 100 μm .^[172] Abbildung 33 zeigt die mittels

Rasterelektronenmikroskopie untersuchte Schaumstruktur des 80:20-Komposits bei a) 100-facher und b) 50-facher Vergrößerung.

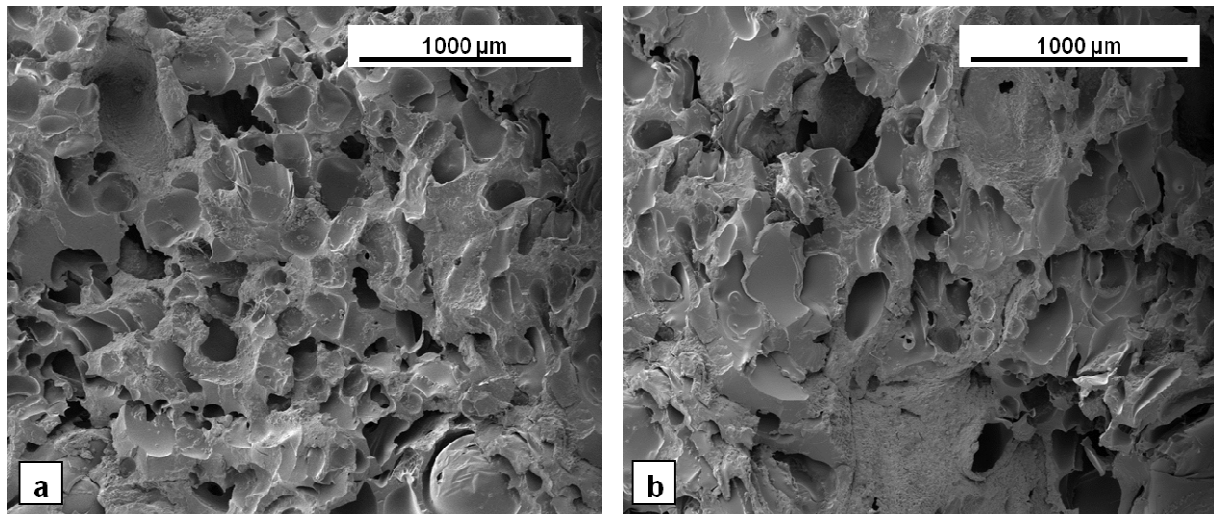


Abbildung 33: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Schaumstruktur des 80:20-Kompositmaterials.

Die Porengröße dieses Schaums weist ähnliche Werte wie das UniDuE-Komposit auf, auch hier haben die Poren einen Durchmesser im Bereich von 200 bis 400 µm. Abbildung 34a zeigt die Schaumstruktur des PCC-12-Komposits bei 77-facher Vergrößerung mit einer ähnlichen Qualität von Porosität und Porengröße.

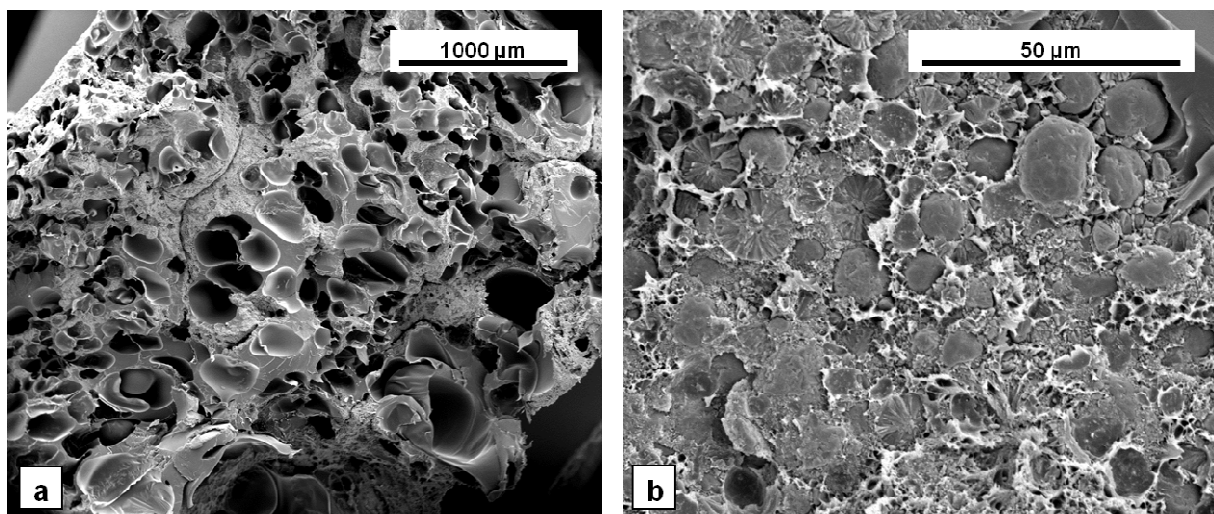


Abbildung 34: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Schaumstruktur des PCC-12-Komposits.

In Abbildung 34b ist besonders gut zu erkennen, wie die einzelnen Calcitkristalle nach dem Schäumungsprozess in die Polymermatrix eingebettet sind und somit zu einer homogenen Verteilung im Material führen.

5.3. Degradation der Kompositmaterialien

Für die langfristige Anwendung der Kompositmaterialien im medizinischen Kontext sind hinreichende Kenntnisse des Degradationsverhaltens von entscheidender Bedeutung. Die Materialien sollten biologisch gut degradierbar und ihr Verhalten im Verlauf der Degradation bekannt sein. Da es sich bei den vorliegenden Kompositmaterialien um ein „neues“ Material handelt, sind empirische Untersuchungen der Degradation zwingend erforderlich, da bereits bekannte Daten nicht direkt auf ein anderes Material übertragen werden können. Beispielsweise kann durch die andere Morphologie der Calcitpartikel der Schaefer Kalk-Komposite gegenüber den Partikeln des UniDuE-Komposits die Degradationskinetik unterschiedlich sein. An dieser Stelle können nur Materialparameter der Degradation erfasst werden.

Für eine Untersuchung des biokompatiblen Verhaltens sind weitere empirische Versuche in biologischen Systemen notwendig. Erst im Tierversuch lässt sich das vollständige Verhalten von hydrolysierbaren Implantaten bei der Interaktion mit dem Organismus beobachten. Die daraus gewonnen Erkenntnisse könnten somit hilfreich sein und durch klinische Studien am Menschen weiter untermauert werden. Aber bereits bei dem Design und der Auslegung neuer Implantatmaterialien sollte auf strukturelle Parameter des Materials geachtet werden. Materialauswahl, Füllstoffe und Porosität beeinflussen die komplexen Vorgänge der Degradation oft in einer Weise, die nur durch empirische Untersuchungen aufgeklärt werden kann. Im Kontakt mit biologischen Systemen spielen die Chemie und der pH-Wert der Umgebung eine große Rolle. Die Kompositmaterialien sind als biodegradierbare Implantate vorgesehen und verbleiben daher für relativ lange Zeit im menschlichen Organismus. Die durch den Schäumungsprozess generierte Porosität im Material sollte ihr osteokonduktives Potential lange genug beibehalten. Schließlich spielt auch der Einsatzzweck des Implantatmaterials eine Rolle, mechanisch sehr beanspruchte Biomaterialien müssen von ihrer Stabilität gänzlich anders ausgelegt sein als in Bereichen, in denen nur kleinere Defekte überbrückt werden müssen.

Im Verlauf der Degradation müssen die Belastungen, die auf ein Implantat wirken, graduell vom umliegenden Gewebe mitgetragen werden. Die Schwierigkeit besteht jedoch in der Koordination von Resorptionsrate und Aufbaugeschwindigkeit des zu ersetzenden Gewebes unter Erhalt von Festigkeit und Stabilität während der Wiederherstellung der physiologischen Anatomie.^[172] Betrachtet man nun die Degradation von PDLLA, so handelt es sich chemisch gesehen um eine Hydrolyse eines Polyesters. Neben der langsamen Hydrolyse des Esters können auch erosive Prozesse zu einer Fragmentierung der Polymerkette führen, die dann ebenfalls hydrolytisch abgebaut werden. Bei der Erosion unterscheidet man die Oberflächen- und die *bulk*-Erosion.^[182]

Wenn die Diffusionsgeschwindigkeit des Wassers in das Material schneller als die Hydrolysegeschwindigkeit ist, so findet der Abbau nicht nur an der Oberfläche des Implantates statt, sondern im gesamten Material. Die Degradation ist beim PDLLA hauptsächlich chemisch bedingt und weniger durch osteoklastäre Resorptionsprozesse geprägt, wie sie bei Calciumphosphatkeramiken üblich sind. Die Esterhydrolyse kann mechanistisch sowohl über einen basen- als auch über einen säurekatalysierten Weg bestritten werden. Eine genaue Beschreibung der Mechanismen findet sich in der Literatur.^[182] Die freiwerdenden sauren Monomere des Polymers können die Hydrolyse autokatalytisch beschleunigen, sofern sie nicht schnell genug aus dem Material abgeführt werden können. Hierbei entstehen kleine mit Monomeren gefüllte Mikrokompimente im Implantat, die neben der autokatalytischen Funktion zu einer Schädigung etwaig eingebrachter Wirkstoffe sowie zur Schädigung peripherer Gewebe führen können.^[182] Durch den Einsatz von Kompositmaterialien, bei denen basische Füllstoffe Verwendung finden, soll diese Gefahr minimiert werden.

Umfangreiche Degradationsuntersuchungen an Kompositen aus PDLLA, PLLA und Carbonat-ACP wurden beispielsweise von SCHILLER im Rahmen seiner Dissertation beschrieben.^[57] Von ANNEN wurde die *in vitro*-Hydrolyse eines gradierten Implantates aus PDLLA, PLLA, Carbonat-ACP und Calcit untersucht.^[71] Die Kinetik der Degradation ist des Weiteren abhängig von der Hydrophilie der Polymermatrix, denn sie bestimmt die Geschwindigkeit der Wasserdiffusion in das Implantatinnere.^[182] Je höher die Hydrophilie ist, desto schneller degradiert das Polymer. Von SHASTEEN *et al.* wurde die Kontrolle der Degradationsgeschwindigkeit von Polylactid für biomedizinische Anwendungen in einem Übersichtsartikel beschrieben.^[256] Hierzu

zählen Möglichkeiten wie die Copolymerisation, die Verwendung von Additiven, die Benutzung von Polymer-*blends* und die Bestrahlung.

Zur Beurteilung des Degradationsverhaltens wurden die aufgeschäumten Formkörper einem Degradationstest unterzogen. Je fünf Probekörper der drei Kompositmaterialien wurden nach der ISO 15814 in 300 ml modifiziertem Sörensen-Puffer bei 37 °C inkubiert und je drei Probekörper in 50 mL Reinstwasser bei 37 °C inkubiert. Der Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 simuliert hierbei physiologische Bedingungen in den verschlossenen Gefäßen. Der Degradationszeitraum betrug 270 Tage.

5.3.1. Stabilität des pH-Werts während der Degradation

Das ursprüngliche UniDuE-Kompositmaterial wurde vom Massenverhältnis PDLLA zum Füllstoff Calcit von SCHILLER dahin gehend optimiert, dass die sauren Degradationsprodukte des PDLLA durch das Calcit gepuffert werden und der pH-Wert im umgebenden wässrigen Medium im Verlauf der Degradation in einem physiologischen Bereich gehalten wird. Da die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Kompositmaterialien unterschiedliche Calcitgehalte aufweisen, gilt es nun die pH-Stabilität dieser Komposite *in vitro* zu bestimmen. Die Wirkung des Calcitgehaltes auf die pH-stabilisierende Wirkung lässt sich nicht quantitativ vorhersagen, so dass sie nur *a posteriori* ermittelt werden kann. Hierzu wurde eine Langzeitstudie über 270 Tage durchgeführt. Die Proben im Sörensen-Puffer repräsentieren etwaige pH-Wert-Veränderungen *in vivo*, während die in Reinstwasser inkubierten Proben zeigen, ob die entsprechenden Calcitgehalte für die Pufferung des Systems ausreichend sind. Die pH-Werte wurden über den gesamten Untersuchungszeitraum jeweils wöchentlich erfasst. Der pH-Wert des Reinstwassers lag zu Beginn des Experiments bei einem Wert von 7 und der des Sörensen-Puffers bei einem pH-Wert von 7,4. Die Abbildungen 35 und 36 zeigen die pH-Werte der Inkubationsmedien im zeitlichen Verlauf für die drei Kompositmaterialien.

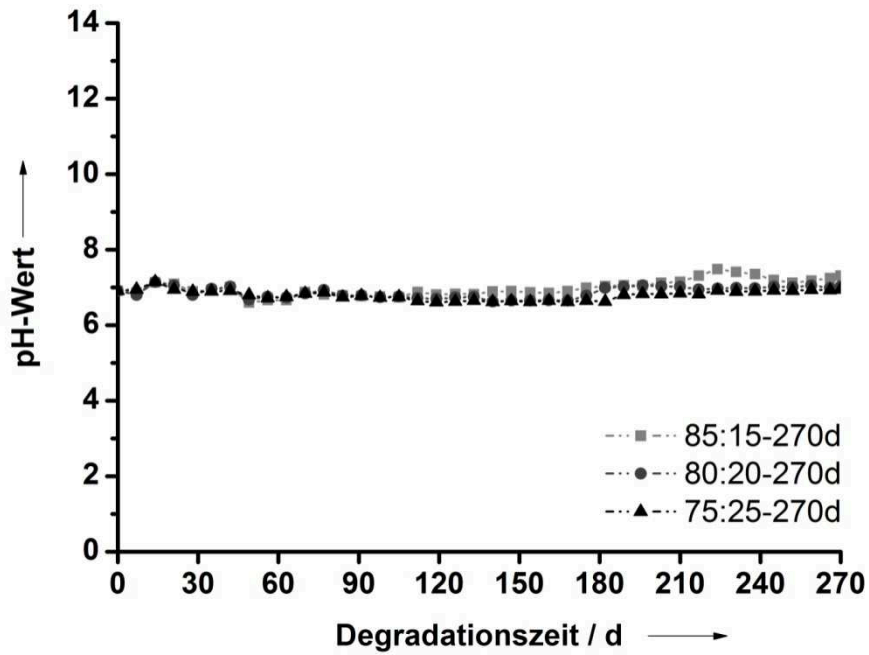


Abbildung 35: Abhängigkeit des pH-Wertes vom Degradationszeitraum in Reinstwasser für die drei unterschiedlich zusammengesetzten Kompositmaterialien.

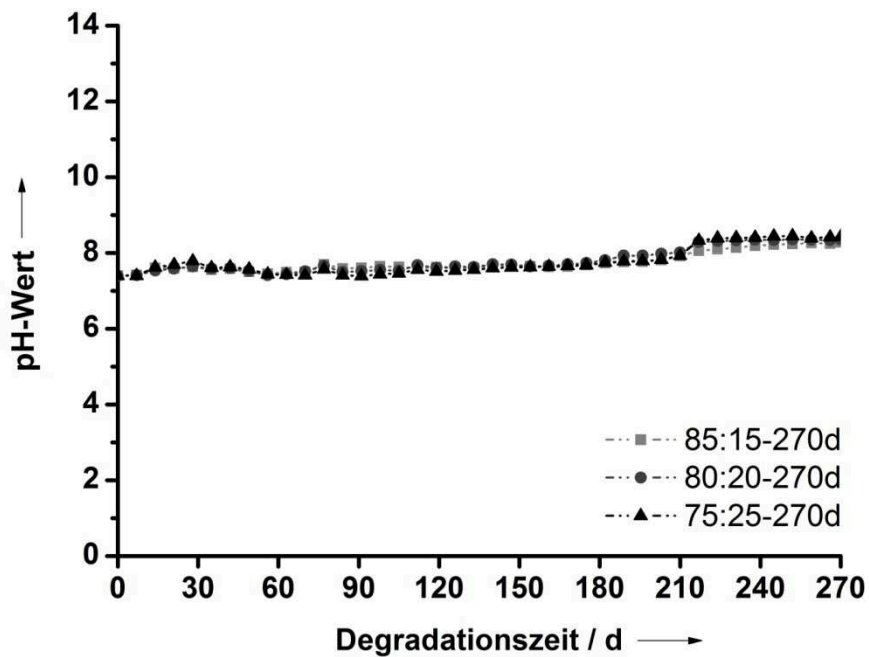


Abbildung 36: Abhängigkeit des pH-Wertes vom Degradationszeitraum im Sørensen-Puffer für die drei unterschiedlich zusammengesetzten Kompositmaterialien.

Der pH-Wert im Verlauf der Degradation zeigt eine gute Stabilität sowohl im Puffer als auch im Reinstwasser für alle drei Kompositmaterialien. Bei den Proben im Reinstwasser zeigt sich ein marginaler Anstieg des pH-Wertes zum Ende des Untersuchungszeitraums. Dieser ist selbst unter den „extremen“ Bedingungen des Reinstwassers verhältnismäßig klein und sollte zu keinen Problemen führen, zumal in biologischen Systemen pufferähnliche Bedingungen vorliegen und durch Konvektionsbewegungen saure Produkte schneller abtransportiert werden.

5.3.2. Massenverluste und Puffer- bzw. Wasseraufnahme

Ein weiterer Satz Probekörper wurde unter den oben genannten Bedingungen im Sörensen-Puffer und im Reinstwasser inkubiert. Diese Proben wurden für die Dreipunktbiegeversuche verwendet und sind anschließend aufgrund der Zerstörung nicht mehr zu verwenden. Anhand unterschiedlicher gravimetrischer Messungen lassen sich aber aus diesen Proben wichtige Erkenntnisse über das Degradationsverhalten der Materialien gewinnen. Anhand der Masse der feuchten Probekörper wurden Rückschlüsse bezüglich der Aufnahme von Inkubationsmedium in die Formkörper gezogen, *ergo* entweder auf die Masse aufgenommenen Wassers oder die Masse des aufgenommenen Puffers. Nach der gründlichen Trocknung der Proben im Vakuumexsikkator bis zur Massenkonstanz wurden die degradationsbedingten Massenverluste der Komposite bestimmt. Die folgenden Abbildungen zeigen das Degradationsverhalten der Kompositmaterialien im zeitlichen Verlauf ihrer Degradation. Hierbei wurde der Massenverlust in Prozent und die Puffer- bzw. Wasseraufnahme in das Material erfasst. Alle Probekörper hatten eine Porosität von 50 %. Abbildung 37 und 38 stellen das Degradationsverhalten in Reinstwasser dar und Abbildung 39 und 40 zeigen das Degradationsverhalten im Sörensen-Puffer.

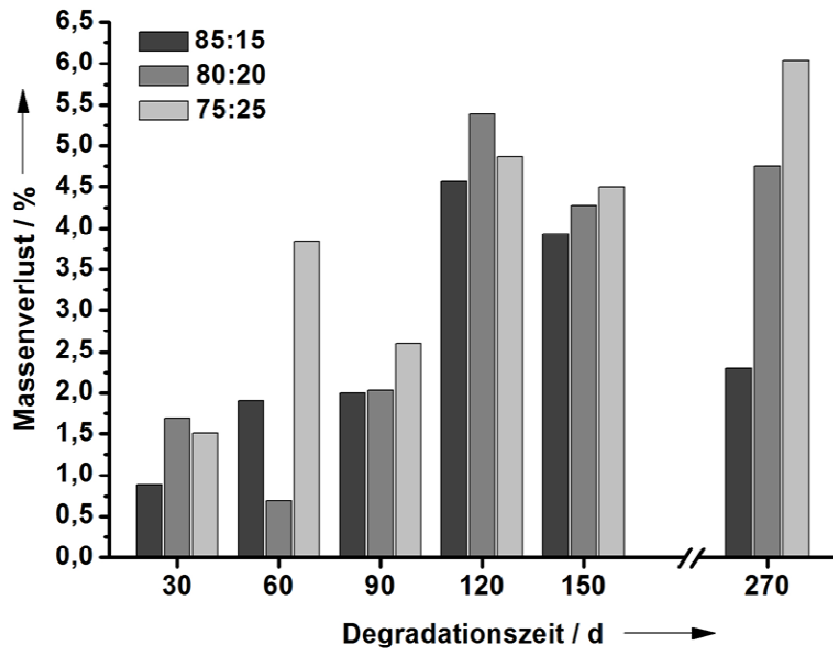


Abbildung 37: Degradationsbedingte Massenverluste der drei Kompositmaterialien im zeitlichen Verlauf in Prozent, gezeigt für die im Reinstwasser inkubierten Proben.

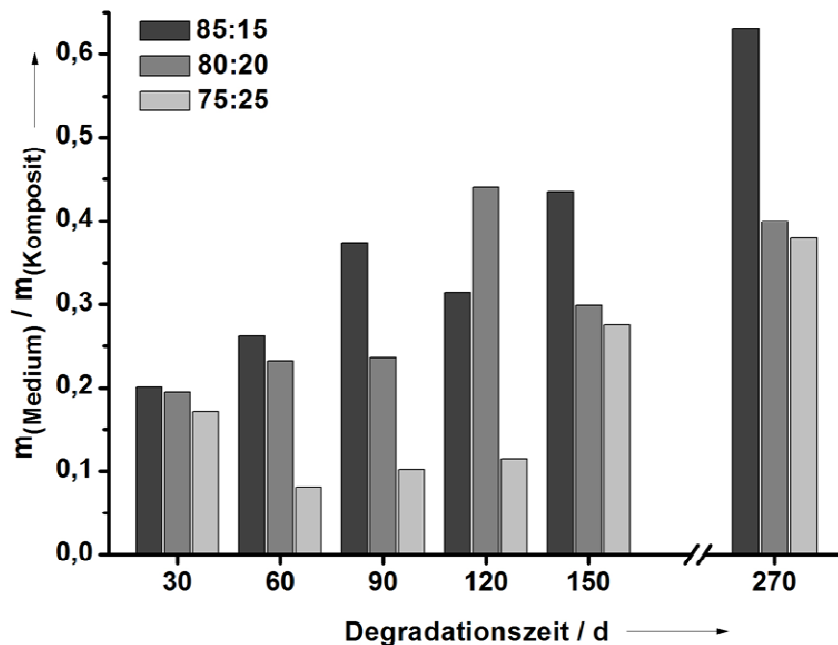


Abbildung 38: Degradationsbedingte Wasseraufnahme je Gramm Komposit der drei Kompositmaterialien im zeitlichen Verlauf, gezeigt für die im Reinstwasser inkubierten Proben.

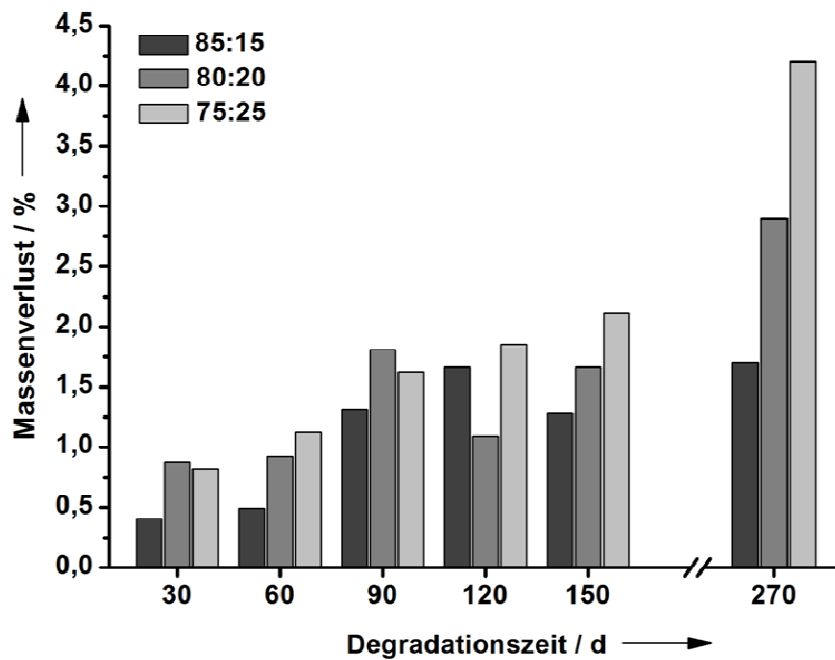


Abbildung 39: Degradationsbedingte Massenverluste der drei Kompositmaterialien im zeitlichen Verlauf in Prozent, gezeigt für die im Sörensen-Puffer inkubierten Proben.

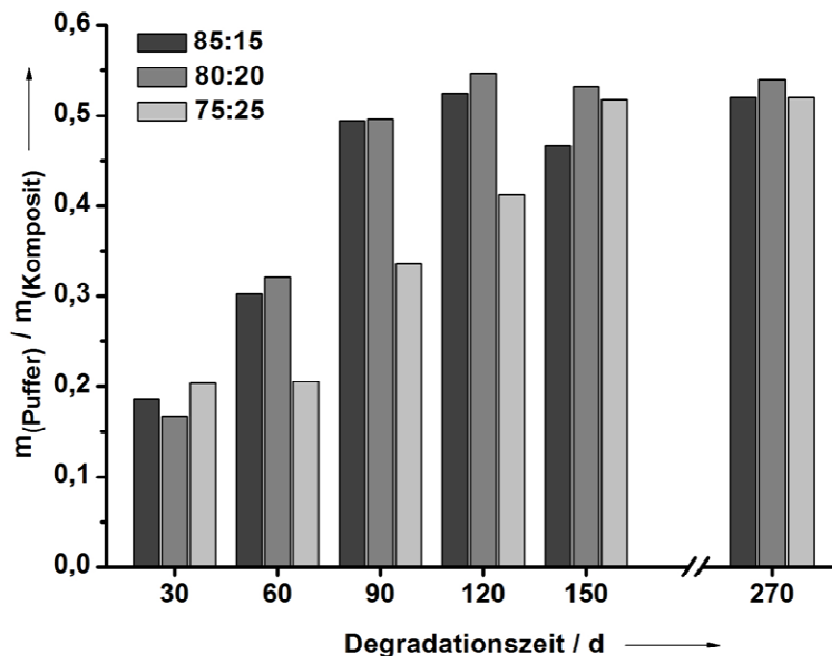


Abbildung 40: Degradationsbedingte Pufferaufnahme je Gramm Komposit der drei Kompositmaterialien im zeitlichen Verlauf, gezeigt für die im Sörensen-Puffer inkubierten Proben.

Betrachtet man die Ergebnisse der Massenverluste der Komposite, so wird deutlich, dass der Massenverlust im Reinstwasser wesentlich höher ausfällt, als der Massenverlust der im Sörensen-Puffer inkubierten Proben. Die Massenverluste im Reinstwasser sind in etwa doppelt so hoch wie die der Proben im Puffermedium. Im Sörensen-Puffer erreichen die Massenverluste Werte von bis zu 2 % nach einer Degradationsdauer von 150 Tagen. Dieser Wert ist sehr gering und bedeutet, dass die Degradation des Materials noch nicht sehr weit fortgeschritten ist. Nach 270 Tagen erkennt man einen deutlichen Anstieg des Massenverlusts bei dem 75:25-Komposit und dem 80:20-Komposit, während der Massenverlust des 85:15-Komposits auf einem vergleichbarem Niveau wie dem bei 150 Tagen liegt. Je größer also der Calcitgehalt in den Proben ist, desto größer fällt der Massenverlust aus. Entweder wird bei diesen Proben mehr von der keramischen Phase in das umgebende Medium ausgewaschen oder die Degradation ist im Falle der höheren Calcitgehalte beschleunigt. Nach 270 Tagen zeigt sich für die Reinstwasserproben der gleiche Trend wie bei den im Puffer inkubierten Proben, auch hier steigt der Massenverlust des 75:25-Komposits und des 80:20-Komposits deutlich an. Absolut gesehen liegen die Werte aber leicht unter denen der Pufferproben. Der Massenverlust des 85:15-Komposits ist im Versuch allerdings geringer als nach 150 Tagen, sodass dieser Wert etwas aus dem Rahmen fällt.

Betrachtet man die Puffer- bzw. Wasseraufnahme der Proben, so zeigt sich für die im Reinstwasser inkubierten Proben ein stetiger Anstieg der Wasseraufnahme im zeitlichen Verlauf der Degradation. Das 85:15-Komposit weist durchschnittlich die größte Wasseraufnahme auf. Bei diesem Komposit ist die Polymerkomponente am größten, folglich kann mehr Wasser aufgenommen werden. Das Wasser diffundiert dabei in die Formkörper und führt zu einem leichten Aufquellen des Materials. Bei den im Sörensen-Puffer inkubierten Proben zeigt sich ein vergleichbarer Trend, allerdings wird hier nach 90 Tagen eine Art Maximum erreicht. Danach erhöht sich die Pufferaufnahme nur noch unwesentlich. Das 75:25-Komposit erreicht dieses Maximum erst nach 150 Tagen. Bei diesem Komposit ist der Polymergehalt am geringsten und damit auch die Aufnahmefähigkeit für das Puffermedium. Die Aufnahme der Inkubationsmedien verdeutlicht die Diffusion der Medien in die kompakten Formkörper. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die Massenverluste niedriger ausfallen als bei den von SCHILLER untersuchten Kompositen.^[57] Bei diesen betrug der Massenverlust ca. 20 %, allerdings wurden

dabei Komposite aus PDLLA und Carbonat-ACP sowie *blends* aus PDLLA, PLLA und Carbonat-ACP mit unterschiedlicher Zusammensetzung in einer Phosphatpufferlösung degradiert. ANNEN konnte Hinweise darauf finden, dass bereits nach 60 Tagen die Diffusion vom Puffermedium in das poröse Material aus PDLLA und Calcit im Verhältnis 80:20 ermöglicht wurde.^[71]

5.3.3. Glasübergangstemperaturen der Kompositmaterialien

Von den degradierten Proben wurden mittels der dynamischen Differenzkalorimetrie Glasübergangstemperaturen des PDLLAs der unterschiedlichen Komposite ermittelt. Die dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) liefert wichtige Hinweise zu Veränderungen im Polymer und liefert somit einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung des Degradationsverhaltens. Bei der Glasübergangstemperatur (T_g) – auch Erweichungstemperatur genannt – handelt es sich um eine wichtige Kenngröße im Bereich der polymeren Werkstoffe. Bei PDLLA handelt es sich um ein amorphes Polymer. Vergleicht man kristalline Polymere mit vollständig amorphen bzw. teilkristallinen Polymeren, so weisen nur kristalline Polymere definierte Schmelzpunkte auf. Kommt es im Rahmen der Degradation zu Veränderungen des Polymers, so sollte sich dies in den Glasübergangstemperaturen widerspiegeln. Man spricht von einem energieelastischen Zustand (hohe Sprödigkeit), wenn man sich unterhalb der Glasübergangstemperatur befindet.^[257] Oberhalb befindet sich ein weicher, entropieelastischer Bereich, bei dem das Material durch eine gummiartige Konsistenz gekennzeichnet ist.^[249] Im Bereich der Glasumwandlung kommt es zu einer größeren Beweglichkeit der Molekülketten, die auch als mikrobrownsche Bewegung bezeichnet wird.^[249] Im Bereich der Implantatmaterialien ist es daher wichtig, Materialien zu nutzen, bei der die Glasumwandlungstemperaturen oberhalb der Körpertemperatur liegen. Im Bereich der Glasumwandlung ändern sich auch andere Parameter wie der Elastizitätsmodul, die spezifische Wärme, der Ausdehnungskoeffizient und die Dielektrizitätskonstante des Materials.^[249]

Bei den Untersuchungen stört das zugesetzte Calcit nicht, da die Thermogramme bis zu einer Temperatur von 100 °C aufgenommen wurden und Calcit somit keiner Phasenumwandlung oder Reaktion unterliegt. Glasumwandlungen lassen sich als endotherme Versetzungen bzw. Stufen im Thermogramm erkennen. Abbildung 41 zeigt das Thermogramm des 85:15-Kompositmaterials im ungeschäumten Zustand. Aus diesem Thermogramm lässt sich die Glasübergangstemperatur von ca. 56 °C

ablesen. Als Glasübergangstemperatur wurde der Wendepunkt im aufsteigenden Abschnitt des endothermen Signals genommen.

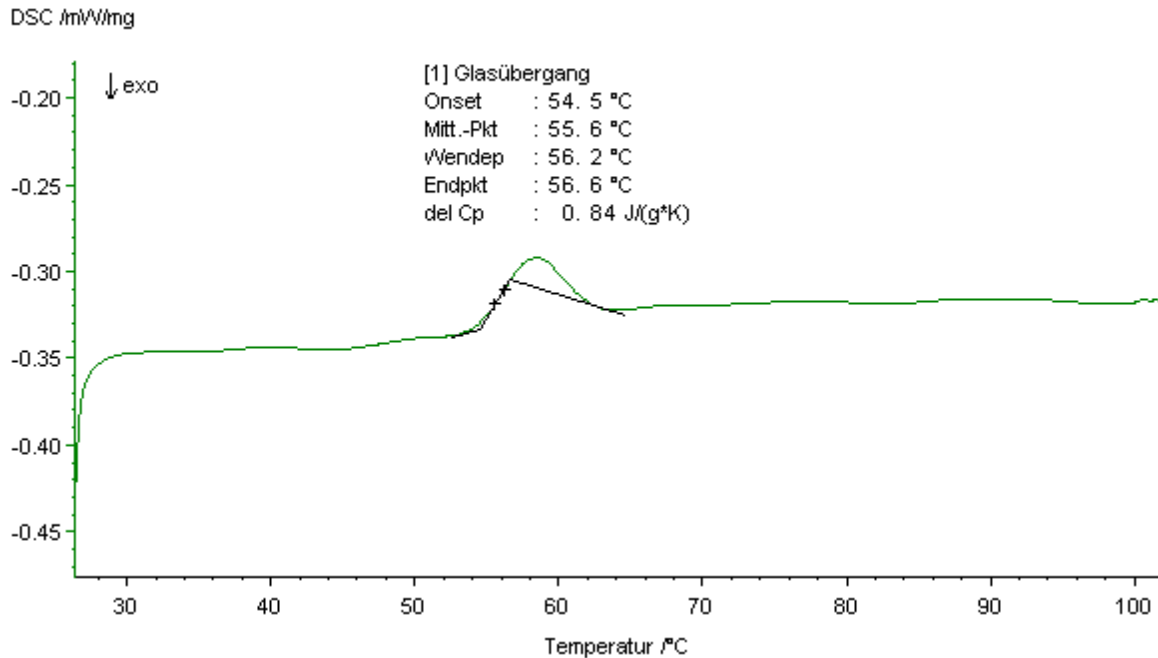


Abbildung 41: Thermogramm des unverarbeiteten 85:15-Kompositmaterials.

Zum Vergleich wurden alle drei Kompositmaterialien in der unverarbeiteten Form, in aufgeschäumter Form und nach 270 Tagen Degradation sowohl im Sörensen-Puffer als auch im Reinstwasser mittels dynamischer Differenzkalorimetrie vermessen und untersucht. In Tabelle 6 sind alle thermoanalytischen Daten der einzelnen Messungen zusammengefasst. Der Glasübergang der unverarbeiteten Komposite liegt in einem Bereich von 55 °C bis 56 °C und entspricht der Glasübergangstemperatur von PDLLA. Nach dem Schäumungsprozess zeigt sich bei allen drei Kompositmaterialien eine Erhöhung der Glasübergangstemperatur um 1 bis 2 K. Wahrscheinlich kommt es durch den Schäumungsprozess zu einer Verzahnung der einzelnen Polymerketten und somit zu einer insgesamt stabileren Packung im Material. Obwohl die Veränderung klein ist, findet sie sich dennoch bei allen drei Kompositmaterialien. Für die degradierten Proben finden sich leicht erniedrigte Glasübergangstemperaturen, ein deutliches Indiz für die Degradation des Polymers und die Aufnahme von Wasser aus dem Medium.

Tabelle 6: Durch dynamische Differenzkalorimetrie ermittelte thermoanalytische Daten der Kompositmaterialien in Abhängigkeit von ihrer Verarbeitungs- und Degradationsform.

Komposit-Material	Glasübergang				
	Onset in °C	Mitt.-Pkt in °C	Wendepunkt in °C	Endpunkt in °C	ΔC_p in J g ⁻¹ K ⁻¹
75-25-0d-Pulver	54,9	55,8	55,9	56,7	0,49
75-25-0d-geschäumt	55,7	56,9	57,7	58,1	0,75
80-20-0d-Pulver	53,6	55,1	55,4	56,6	1,02
80-20-0d-geschäumt	54,8	55,6	56,9	56,5	0,56
85-15-0d-Pulver	54,5	55,6	56,2	56,6	0,84
85-15-0d-geschäumt	55,5	56,7	57,5	57,8	0,68
75-25-270d-Reinstwasser	51,6	52,9	53,4	54,3	0,87
75-25-270d-Puffer	52,4	53,4	54,4	54,5	0,67
80-20-270d-Reinstwasser	51,1	52,8	53,2	54,4	1,31
80-20-270d-Puffer	52,5	53,7	54,4	54,8	0,79
85-15-270d-Reinstwasser	52,4	53,6	54,2	54,7	0,79
85-15-270d-Puffer	52,6	53,7	54,1	54,8	0,72

Hier zeigt sich eine Beobachtung, die sich mit den untersuchten Massenverlusten der Proben deckt. Die im Reinstwasser degradierten Proben zeigen eine größere Abweichung von den Anfangstemperaturen als die im Sörensen-Puffer degradierten

Proben. Dies spricht für eine schnellere Degradation im Reinstwasser, bei der auch die Massenverluste im Degradationsverlauf größer waren als die im Puffer inkubierten Formkörper. Die Erweichungstemperatur ist um ca. 2 bis 3 K bei den im Reinstwasser degradierten Proben geringer, gegenüber der ursprünglichen Glasübergangstemperatur. Bei den Pufferproben ist die Temperatur im Gegensatz dazu um 1 bis 2 K verringert. Für die Eignung als Implantatmaterial ist das eine gute Voraussetzung, größere Temperaturabweichungen des Glasübergangs wären für die Eignung bedenklich. Für die Anwendung spielt die Körpertemperatur des Organismus die entscheidende Rolle, da die Glasübergangstemperaturen aber über den gesamten Degradationszeitraum immer noch über 50 °C liegen, ist zumindest für dieses Zeitfenster mit keiner Komplikation zu rechnen. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Untersuchungen von SCHILLER, die von ihm verwendeten Kompositmaterialien zeigen nach 270 Tagen ebenfalls Glasübergangstemperaturen von über 50 °C.^[57] Obwohl hier die Zusammensetzung des Materials von den hier vorgestellten Kompositen abweicht, so ist doch nur das PDLLA maßgeblich für den Glasübergang verantwortlich. Weiterführende Informationen zum Glasübergang finden sich bei MANO *et al.*, die das Glasübergangsverhalten unter dem Einfluss der Kristallinität von PLLA mittels DSC untersuchten.^[258]

5.3.4. Morphologie der degradierten Kompositmaterialien

Um das Material im Verlauf der Degradation besser zu charakterisieren, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Bruchflächen der einzelnen Formkörper angefertigt. Somit kann eine qualitative Beurteilung des Materials vorgenommen werden und Fragen bezüglich der Integrität, der Porosität, der Morphologie und der Struktur des Materials beantwortet werden. Somit lassen sich Indizien und Hinweise auf erosive Prozesse auf kleinster struktureller Ebene frühzeitig erkennen. Rein makroskopisch sind im Verlauf der Degradation keine Unterschiede der Formkörper zu erkennen. Es stellt sich die Frage, wie das Material im Inneren aussieht und ob Spuren des Sörensen-Puffers zu finden sind. Die folgenden Abbildungen stellen repräsentative Aufnahmen der degradierten Formkörper dar und zeigen typische Veränderungen, die sich an den inkubierten Proben im Verlauf der Degradation beobachten lassen. Generell zeigt sich innerhalb der drei Kompositmaterialien kein großer Unterschied bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Degradation. Abbildung 42 zeigt

die Bruchfläche des 80:20-Komposits nach 150 Tagen Degradation bei a) 140-facher Vergrößerung im Sörensen-Puffer inkubiert und b) bei 10000-facher Vergrößerung in Reinstwasser inkubiert. Abbildung 43 zeigt die Bruchfläche des 80:20-Komposits nach 150 Tagen Degradation in Sörensen-Puffer bei a) 600-facher Vergrößerung und b) bei 10000-facher Vergrößerung.

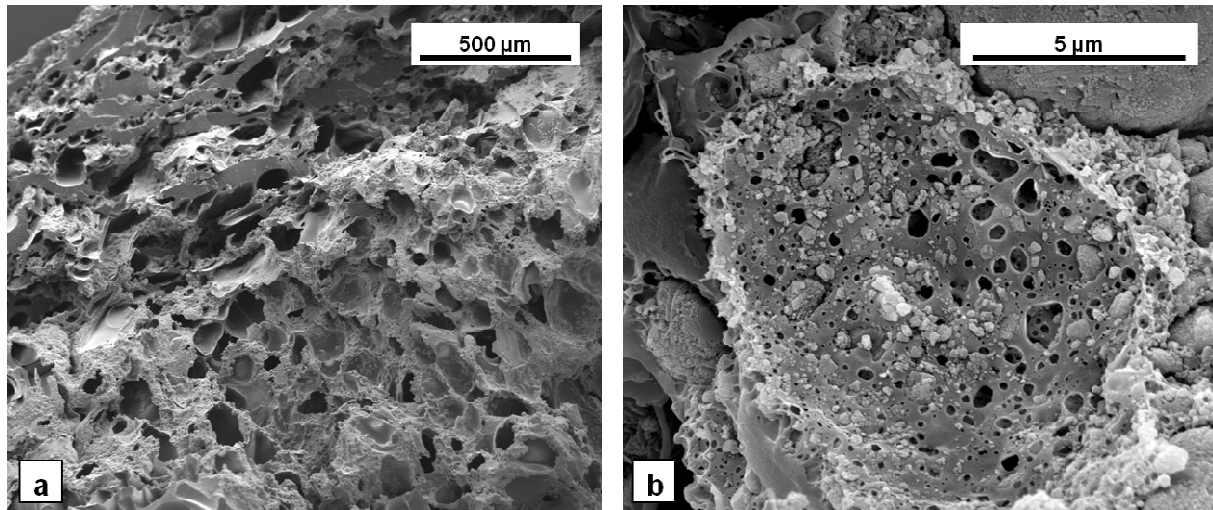


Abbildung 42: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des 80:20-Komposits nach 150 Tagen Degradation in: a) Sörensen-Puffer und b) Reinstwasser.

Nach 150 Tagen ist die typische Schaumstruktur noch sehr gut erhalten. Es gibt keine größeren Auffälligkeiten oder Veränderungen der Porosität in Abbildung 42a.

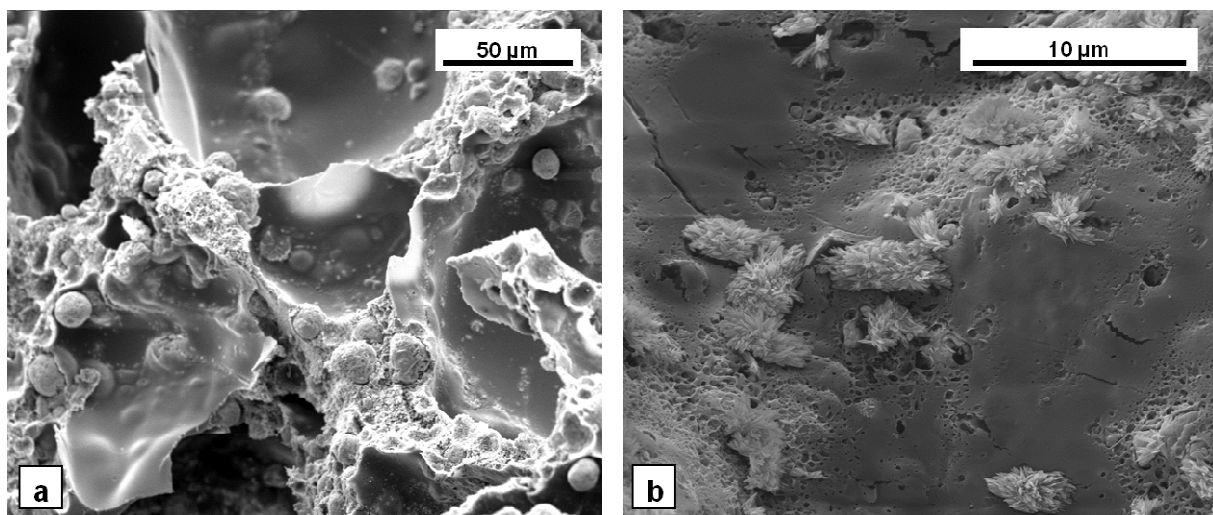


Abbildung 43: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des 80:20-Komposits nach 150 Tagen Degradation im Sörensen-Puffer.

Bei genauerer Betrachtung lassen sich an den Porenwänden jedoch kleine angeraute Bereiche erkennen. In Abbildung 42b ist eine Pore bei hoher Vergrößerung gezeigt. Deutlich zu erkennen sind kleinere Löcher innerhalb der Pore, wo polymeres Material durch erosive Prozesse abgetragen wurde. Die einzelnen Calcitkristalle sind nicht mehr komplett in die Polymermatrix eingebettet, sondern liegen teilweise frei. Die Pore selbst und damit die Porosität sind weiterhin vorhanden, jedoch beginnen die Porenwände zu degradieren. Dies hat theoretisch den Vorteil, dass dadurch die Poren untereinander durch ein interkonnektierendes System verbunden werden können, sodass ein Stoffaustausch ermöglicht und ein osteokonduktives Potential im Verlauf der Degradation verstärkt wird. In diesem Zusammenhang wären weitere biologische Untersuchungen sinnvoll. Abbildung 43a zeigt eine Aufsicht auf eine degradierte Porenwand, bei der deutlich die sphärischen Calcitpartikel zu sehen sind. In Abbildung 43b sind auskristallisierte Bestandteile des Sörensen-Puffers im Inneren der Probe zu erkennen. Dies ist ein Indiz dafür, dass das Medium mit den gelösten Salzen den Formkörper komplett durchdrungen hat. Abbildung 44a zeigt das 80:20-Komposit nach 270 Tagen Degradation in Reinstwasser bei 20000-facher Vergrößerung. Abbildung 44b zeigt das 85:15-Komposit nach 270 Tagen Degradation in Reinstwasser bei 5000-facher Vergrößerung.

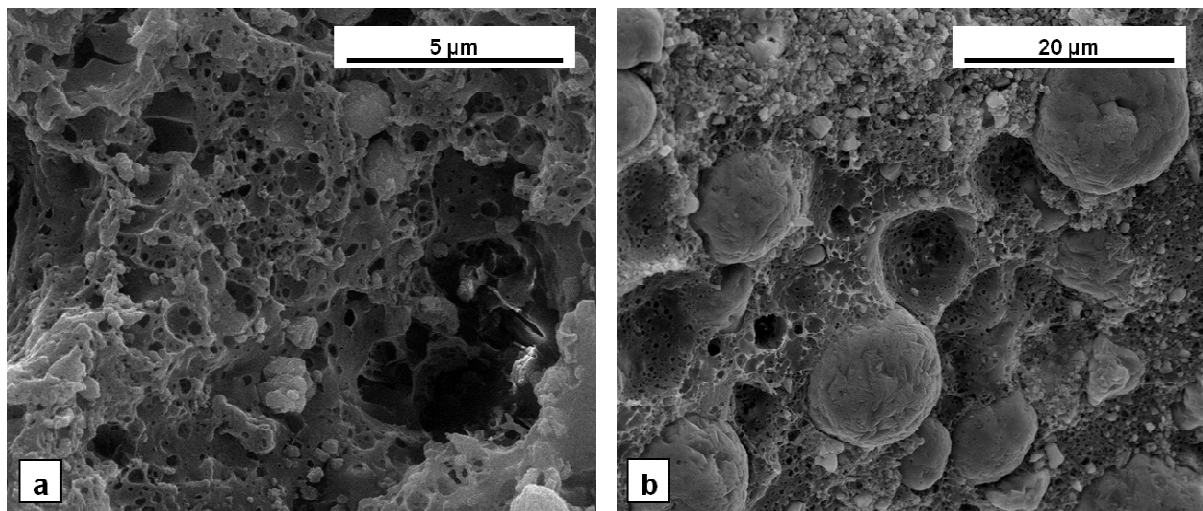


Abbildung 44: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 270 Tagen Degradation im Sörensen-Puffer: a) des 80:20-Komposits und b) des 85:15-Komposits.

In Abbildung 44a ist eine stark zerklüftete Morphologie des 80:20-Komposits zu erkennen, die Degradation ist sichtlich vorangeschritten. Innerhalb der Wände sind viele kleine Löcher zu erkennen, die den Blick auf darunterliegende noch kleinere Poren ermöglichen. Abbildung 44b zeigt das 85:15-Komposit, sehr gut zu erkennen ist die sphärische Morphologie der Calcitpartikel. Man erkennt die Kavitäten, in denen weitere Calcitpartikel platziert waren, die nun leer sind und in ihrem Inneren viele kleine Löcher aufweisen. Durch erosive Prozesse werden die Partikel aus ihrem Polymerverbund freigelegt. Durch die Degradation sind auch an den Calcitkristallen leichte Veränderungen zu erkennen, das Relief der Oberfläche ist weniger glatt als im Ausgangszustand und etwas angerauter. Weiterführende Untersuchungen zum hydrolytischen Degradationsverhalten von Polylactid unter dem Einfluss von Temperatur und pH-Wert finden sich beispielsweise bei Li *et al.*^[259]

Entscheidend für die Eignung eines Implantatmaterials ist aber die mechanische Stabilität der Kompositmaterialien, die im nächsten Kapitel behandelt wird.

5.4. Mechanische Kenngrößen der Kompositmaterialien

Nachdem die Degradation der drei Kompositmaterialien untersucht wurde, stellt sich die Frage nach der mechanischen Stabilität der Materialien. Für die Entwicklung und Auslegung neuer Implantate ist die Kenntnis von grundlegenden mechanischen Kenngrößen der Kompositmaterialien von enormer Bedeutung. Je nach Einsatzgebiet kommt den mechanischen Eigenschaften unterschiedliche Bedeutung zu. Beispielsweise müssen Biomaterialien zur Wundabdeckung nicht so stabil sein wie Knochenersatzmaterialien, die tragende und stützende Aufgaben im Organismus übernehmen. Dabei ist die quantitative Bestimmung mechanischer Kenngrößen wesentlich schwieriger als qualitative Beschreibungen der Eigenschaften.^[34] Die mechanischen Eigenschaften des UniDuE-Komposits wurden bereits bestimmt und haben die Eignung des Materials als adäquaten Knochenersatz bestätigt.^[71, 72] Die mechanischen Eigenschaften der hier vorgestellten, mechanisch compoundingierten Komposite sind völlig unbekannt. Es lässt sich nicht vorhersagen, inwieweit der veränderte Kompositherstellungsprozess zu einer geringeren oder stabileren Festigkeit der geschäumten Materialien führt. Um die Komposite mit dem altbewährten System vergleichen zu können, ist neben der Charakterisierung und Untersuchung der Degradationseigenschaften auch die Erfassung mechanischer Kenngrößen für die Beurteilung der vorliegenden Materialien unumgänglich. Hierzu

wurden gängige mechanische Kenngrößen wie der E-Modul und die Biegefestigkeit der Formkörper ermittelt. Die mechanischen Daten wurden über die Methode der Dreipunktbiegung erfasst, wobei die mechanischen Eigenschaften insbesondere in Abhängigkeit von der Degradationszeit von großem Interesse sind. Im Verlauf der Degradation nimmt das Material Wasser auf, sodass Veränderungen auf mikroskopischer Ebene zu veränderten Eigenschaften unter mechanischer Beanspruchung führen können. Die Formkörper sind hinsichtlich ihrer Abmessungen in Anlehnung an die ISO-EN-Norm 178 hergestellt worden, ebenso wurde die Versuchsdurchführung gemäß dieser Norm durchgeführt. Die Formkörper mit den Maßen 80 mm · 8 mm · 4 mm dienen im Dreipunktbiegeversuch als Biegebruchstab. Zunächst wurden die Proben der drei Kompositmaterialien im nicht degradierten und damit trockenen Zustand untersucht und ihre Kenngrößen erfasst. Von jedem der drei Kompositmaterialien standen acht Probekörper zur Verfügung. Für die degradierten und feuchten Proben standen ebenfalls jeweils acht Probekörper zur Verfügung. Die Messung der mechanischen Parameter erfolgte jeweils nach 30, 60, 90, 120, 150 und 270 Tagen. Die acht Probekörper setzten sich aus den fünf Sörensen-Puffer-Proben und den drei Reinstwasser-Proben zusammen. Dazu wurden die einzelnen Formkörper aus dem Medium geholt und oberflächlich abgetrocknet, um ein möglichst physiologisches Milieu im Inneren der Probe zu erhalten. In den Fällen, wo es zu Fehlversuchen aufgrund von frühzeitigen oder asymmetrischen Brüchen der Probekörper kam, wurden die Daten aus der anschließenden Mittelung der Messergebnisse herausgenommen. Klar erkennbare Ausreißer unter den Werten wurden ebenfalls aus der Statistik genommen, da diese Werte sonst ein falsches Bild widerspiegeln würden.

5.4.1. Mechanische Kenngrößen der trockenen Kompositmaterialien

In Tabelle 7 sind die Messergebnisse der Dreipunktbiegung der trockenen Kompositmaterialien dargestellt. Die gemessenen E-Moduln und die Biegefestigkeit sind als Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung (σ_x) angegeben. Zum Vergleich sind die mechanischen Kenngrößen des UniDuE-Komposits aus vorherigen Messungen mit aufgeführt.^[71, 72] Die ISO-EN-Norm 178 fordert von den Abmessungen der Probe eine Breite von 10 mm. Von ANNEN wurde jedoch gezeigt, dass aufgrund der großen Streuung der E-Moduln bei den vorherigen Messungen der 10 mm breiten Biegebruchstäbe 8 mm breite Proben besser geeignet sind und

weniger Streuungen der Messwerte zeigten.^[71] Daher wurden die Probekörper von vornherein mit einer Breite von 8 mm gefertigt, dennoch ist es somit nicht mehr streng ISO-Norm konform. Entscheidend ist aber der Vergleich der Komposite untereinander und relativ zum Ausgangszustand.

Tabelle 7: Gemessene *E*-Moduln und Biegefestigkeit der drei geschäumten Kompositmaterialien im trockenen Zustand. Zum Vergleich sind die Daten des UniDuE-Komposits mit aufgeführt.^[71, 72] Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen.

Massenverhältnis des Kompositmaterials PDLLA:Calcit	Mittelwerte und Standardabweichung			
	<i>E</i>	σ_x	σ_{fM}	σ_x
	in MPa	in MPa	in MPa	in MPa
85:15	868	94	22,24	3,60
80:20	854	92	14,82	1,34
75:25	988	107	17,64	2,98
UniDuE 80:20	960	69	19,70	2,30

Die Mittelwerte der *E*-Moduln liegen im Bereich von 900 bis 1000 MPa, die Mittelwerte der Biegefestigkeit liegen im Bereich zwischen 15 und 22 MPa. Der Vergleich mit dem UniDuE-Komposit zeigt, dass die mechanischen Eigenschaften der drei neuen Kompositmaterialien keine signifikanten Abweichungen zeigen und somit ebenfalls den Anforderungen an ein Implantatmaterial genügen. Hieraus ist ersichtlich, dass der mechanische Compoundierungsprozess der Kompositmaterialherstellung zu keiner Abnahme der Festigkeit führt. Die Werte der *E*-Moduln für das 75:25-Komposit weisen die höchsten Werte auf. Bei diesem Komposit ist der Füllstoffgehalt und damit auch die Steifigkeit des Materials am höchsten. Die *E*-Moduln der anderen beiden Komposite liegen relativ nah beieinander. Insgesamt liegen die *E*-Moduln der Kompositmaterialien im Größenordnungsbereich der Kennwerte des spongiösen Knochens und könnten grundsätzlich als Knochenersatzmaterial eingesetzt werden.^[34] Für mechanisch sehr beanspruchte Knochenbereiche sollten aber stabilere Lösungen bevorzugt werden. Weiterführende Betrachtungen über Struktur- und mechanische Funktionsbeziehungen im Knochen finden sich bei WEINER *et al.*^[1]

Die Ergebnisse der Dreipunktbiegung werden in einem Spannungs-Dehnungs-Diagramm festgehalten. Ein repräsentatives Diagramm des 85:15-Komposits ist in Abbildung 45 gezeigt.

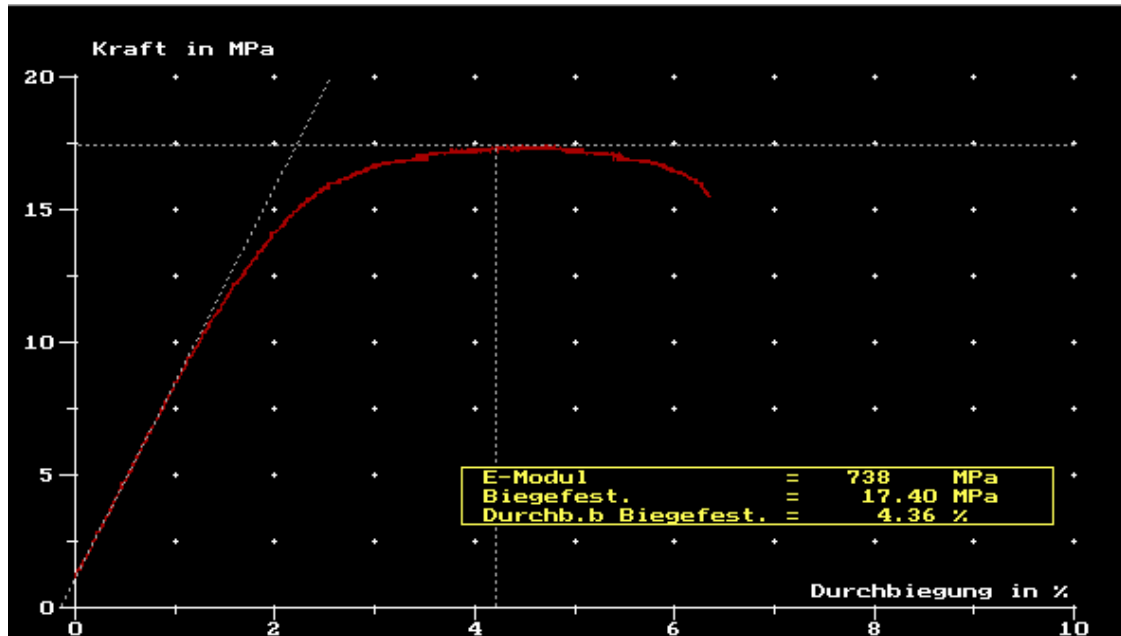


Abbildung 45: Generelles und repräsentatives Spannungs-Dehnungs-Diagramm des 85:15-Kompositmaterials.

5.4.2. Mechanische Kenngrößen der Kompositmaterialien

Da die Kompositmaterialien als potentielle Implantate für längere Zeitspannen im menschlichen Organismus verbleiben, ist die Kenntnis mechanischer Kenngrößen in Abhängigkeit der Degradationszeit von besonderer Bedeutung. Sobald die Formkörper in Kontakt mit biologischen Systemen kommen und Wasser aufnehmen, können sich die mechanischen Eigenschaften verändern. Es ist sinnvoll diese Veränderungen zu ermitteln und Unregelmäßigkeiten frühzeitig zu erkennen. Hierzu wurde eine Langzeituntersuchung durchgeführt und die Formkörper der drei Komposite in regelmäßigen Abständen durch die Methode der Dreipunktbiegung vermessen. Dazu wurden für jeden Messzeitpunkt acht Probekörper inkubiert, jeweils fünf im Sörensen-Puffer und drei im Reinstwasser bei 37 °C. Die Abbildungen 46 und 47 zeigen die Messergebnisse der gemittelten *E*-Moduln bzw. Biegefestigkeit der drei Kompositmaterialien in Abhängigkeit von der Degradationszeit.

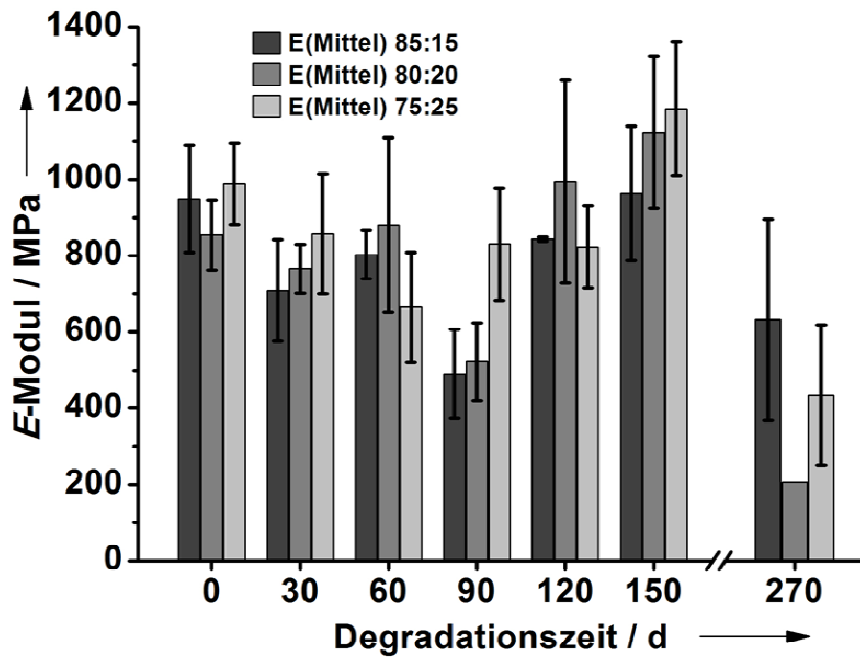


Abbildung 46: Gemittelte E -Moduln der drei Kompositmaterialien in Abhängigkeit von der Degradationsdauer.

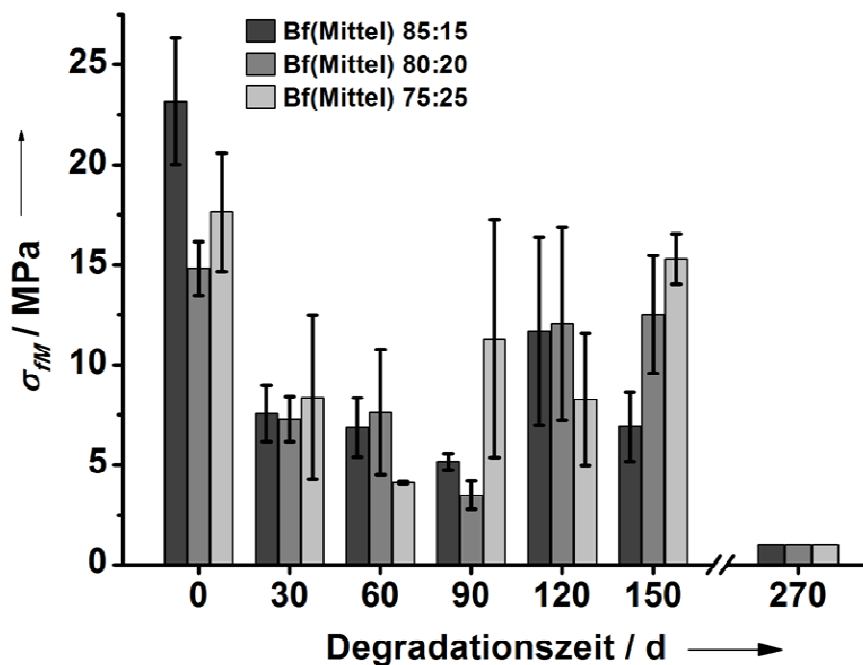


Abbildung 47: Gemittelte Biegefestigkeit der drei Kompositmaterialien in Abhängigkeit von der Degradationsdauer.

Aus den Messungen der Dreipunktbiegung lassen sich einige Tendenzen im Verlauf der Degradation erkennen. Die fortschreitende Degradation führt bei den einzelnen Messungen zu vermehrten asymmetrischen oder frühzeitigen Brüchen der Formkörper. Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen dem Füllstoffgehalt des Komposits und der Anzahl der Fehlmessungen. Beim 75:25-Komposit ist der Füllstoffgehalt am höchsten, hier finden sich auch die größten Ausreißer unter den Messwerten. Zu Beginn wurde das Schäumungsverhalten der einzelnen Komposite untersucht. Hierbei wurde dargestellt, dass die makroskopische Qualität der Formkörper mit dem Füllstoffgehalt korreliert. Je größer der Füllstoffgehalt bei den Kompositen ist, desto schlechter und inhomogener sind die geschäumten Materialien. Das erklärt die größere Zahl an Ausreißern bei den Messungen des 75:25-Komposits. Im Verlauf der ersten 90 Degradationstage nehmen die Werte der *E*-Moduln und die Werte der Biegefestigkeit tendenziell ab, dies entspricht der Erwartung. Durch degradationsbedingte Prozesse sollte sich die Festigkeit im Laufe der Zeit verringern. Beim 80:20-Komposit erreichen die Messwerte der *E*-Moduln beispielsweise ungefähr zwei Drittel der anfänglichen Werte, die Biegefestigkeit ist auf ungefähr ein Drittel der ursprünglichen Werte verringert. Nach 150 Tagen Degradation steigen die Werte der *E*-Moduln und Biegefestigkeit wieder leicht an. Bemerkenswert ist die Tendenz bei den *E*-Moduln der Proben, die Mittelwerte liegen hier sogar über den Werten der nicht degradierten Formkörper. Es müssen also strukturelle Vorgänge innerhalb des Materials zu diesen Erhöhungen der Messwerte geführt haben. Zu Beginn wurde das Degradationsverhalten der Kompositmaterialien untersucht (vgl. Kap. 5.3.2), auch hier lässt sich wieder ein Zusammenhang herstellen. Nach 150 Tagen Degradation der Proben liegt der Massenverlust im Bereich von 2 % bis 4 %. Die Degradation sollte hierbei noch nicht zu stark sein, allerdings zeigt sich auch, dass die einzelnen Formkörper das umgebende Medium aufnehmen. Im Falle des Sörensen-Puffers zählen auch dessen Salze dazu, die konzentrationsbedingt innerhalb des Kompositmaterials beim Trocknen ausfallen können. Insgesamt könnte das aufgenommene Medium zu einer Versteifung des Materials beitragen, was wiederum die erhöhten Messwerte erklären würde. Die mechanischen Kenngrößen waren nach 270 Tagen Degradation wesentlich schwieriger zu erfassen, da die fortschreitende Degradation bereits zu Brüchen der einzelnen Biegebruchstäbe vor der eigentlichen Messung führte. Die Werte der Biegefestigkeit konnten nicht zufriedenstellend ermittelt werden und lagen um den

Wert von 1 MPa. Die Werte der *E*-Moduln sind gegenüber den Werten nach 150 Tagen Degradation deutlich reduziert. Beim 80:20-Komposit konnte keine Statistik angefertigt werden, da nur eine Probe stabil genug war, um eine ordnungsgemäße Messprozedur durchzuführen. Insgesamt ist die Integrität der Formkörper nach 270 Tagen Degradation deutlich herabgesetzt.

Im Vergleich mit dem UniDuE-Komposit zeigt sich ein abweichendes Verhalten der mechanischen Kennwerte im Verlauf der Degradation. Die Formkörper wurden hier in einer Phosphat-Pufferlösung inkubiert und nach 42 Tagen und nach 56 Tagen durch die Dreipunktbiegung vermessen.^[71, 72] Die Messwerte der *E*-Moduln sind innerhalb der Degradationszeit auf etwa 1700 MPa angestiegen, während die Messwerte der Biegefestigkeit auf einem vergleichbaren Niveau blieben. Eine Erklärung dieser Diskrepanz könnte in einem anderen Diffusionsverhalten des Mediums in das Innere der Formkörper begründet sein. Aus einer verstärkten Inkorporation des Mediums innerhalb der ersten Wochen könnte eine höhere Festigkeit resultieren. Interessant wäre hier ein längerer Degradationszeitraum für die Untersuchung des UniDuE-Komposits. Weiterführende Überlegungen zur Festigkeit des Knochens im Zusammenhang mit mechanischen Kenngrößen finden sich bei CURREY.^[260]

5.5. Aufschäumen großvolumiger Probekörper

Nachdem einige grundlegende Untersuchungen zum Degradationsverhalten und zum mechanischen Verhalten der Kompositmaterialien gewonnen wurden, stellt sich die Frage nach der technologischen Umsetzung eines größeren Implantates. Bis jetzt wurden nur Formkörper mit relativ geringer Größe aufgeschäumt. Für die Zukunft ist seitens der Projektpartner die komplette Umsetzung in ein individuelles, formgebundenes Implantat zur knöchernen Rekonstruktion vorgesehen. Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, wurden Proben mit einem größeren Volumen aufgeschäumt. In dieser Machbarkeitsuntersuchung sollen erste Erkenntnisse zum Schäumungsverhalten größerer Formkörper gewonnen werden. Entscheidend ist hier vor allem, ob die Integrität der Formkörper sowie die innere Struktur gewahrt werden können. Die Porosität sollte im gesamten Material homogen vorhanden und das Implantat als solches gleichmäßig geschäumt sein. Auch die Prozessparameter wie die Begasungszeit sollten ausreichend sein, um eine komplette Diffusion des Kohlenstoffdioxids bis in den Mittelpunkt der Form zu gewährleisten. Erste

Untersuchungen an geometrisch anspruchsvolleren Implantaten wurden beispielsweise bereits von SCHILLER *et al.*^[60] und WEIHE *et al.*^[66] beschrieben. Hierbei handelt es sich um gradierte Implantate, bei denen nur die innere poröse Schicht aus PDLLA und Calciumcarbonat besteht und geschäumt wurde. Die anderen Schichten wurden gepresst. Bei dem Verfahren konnten erste individuelle Implantate generiert werden.

5.5.1. Explosionsartige Schäumung des Kompositmaterials

Um eine schnellere Diffusion des Kohlenstoffdioxids in die Form zu ermöglichen, wurden Formen aus makroporösem Aluminium von der Firma Karl Leibinger Medizintechnik GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um zylindrische Hohlformen mit einem Innendurchmesser von 10 cm und einem Volumen von 81,34 cm³. In diesem Kapitel wird ein fehlgeschlagenes Experiment vorgestellt, aus dem interessante Erkenntnisse zur Erzeugung poröser Materialien gewonnen werden konnten. Bei der in diesem Experiment verwendeten Form handelt es sich um einen makroporösen Aluminiumring in der Mitte, zwei Elemente aus PTFE und zwei Stahlplatten zur Stabilisierung der Form während der Begasung. Die Form wurde mit 56 g eines aus PDLLA und PCC-12 µm Calcitpartikeln bestehenden Komposits mit einer Dichte von 1,37 g cm⁻³ befüllt und zu einer 50-prozentigen Porosität aufgeschäumt. Abbildung 48a zeigt die befüllte und verschraubte Form vor dem Begasen.

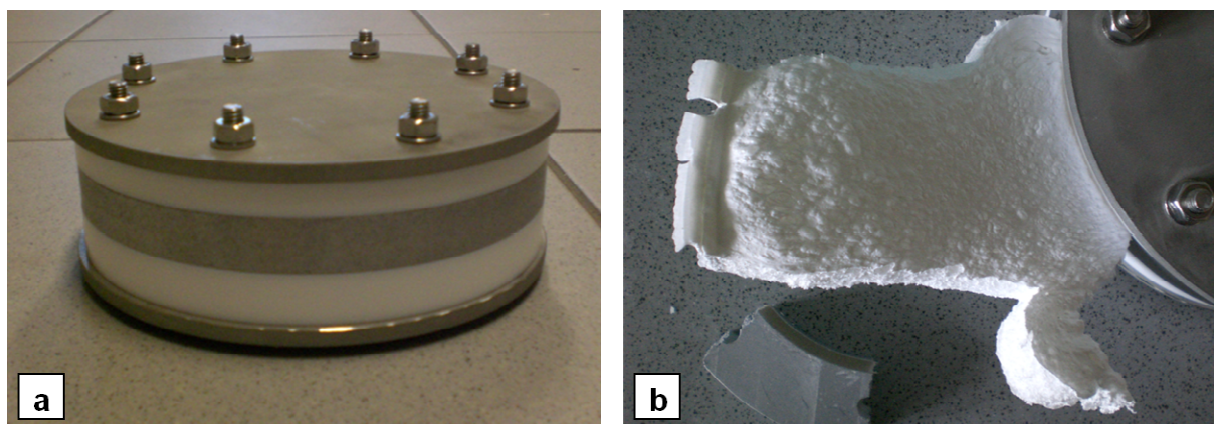


Abbildung 48: a) Großvolumige Form zum Aufschäumen, bestehend aus einer porösen Mantelfläche aus Aluminium, zwei PTFE-Elementen und zwei Stahlplatten und b) einem geborstenen Aluminiumring nach dem Begasen und mehrtägiger Standzeit.

Nach dem Aufschäumen ($t = 2 \text{ h}$; $T = 37 \text{ °C}$; $p(\text{CO}_2) = 100 \text{ bar}$) und dem Druckablassen wurde die Form zur Akklimatisierung mehrere Tage bei Raumtemperatur verschlossen gelassen. Beim Öffnen der Form kam es zu einer explosionsartigen Schäumung des Materials, bedingt durch den Bruch der makroporösen Mantelfläche aus Aluminium. Das Öffnen der Form bewirkte eine spontane Entweichung des angestauten Kohlenstoffdioxids und sorgte damit für eine unmittelbare Schäumung entlang des Gasstromes aus der Form heraus. Der entstandene Schaum erstarrte daraufhin sofort zu einem festen Formkörper. Abbildung 49a zeigt die Aufsicht auf die geöffnete Form mit dem nach außen hin geschäumten Teilstück. Abbildung 49b zeigt den geborstenen Aluminiumring der Form.

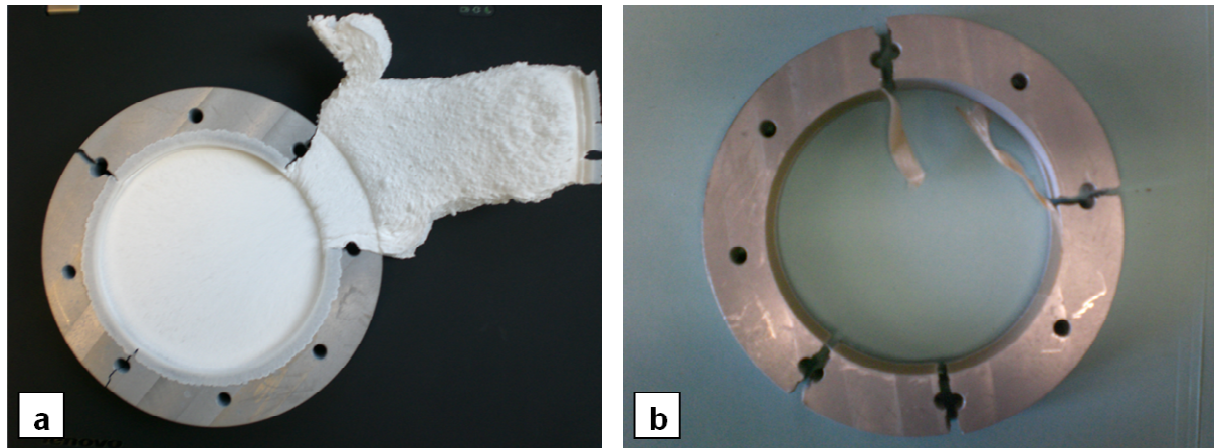


Abbildung 49: a) Aufsicht auf die geöffnete Form mit nach außen hin explosionsartig geschäumten Teilstück und b) geborstenem makroporösen Aluminiumring der Form.

An diesem Experiment wird besonders deutlich, dass bei großen Formkörpern große Mengen an Kohlenstoffdioxid im Material verbleiben können und eine ausreichende Akklimatisierungszeit der Form von Nöten ist. Das Kohlenstoffdioxid muss aus dem Material heraus diffundieren, bei größeren Formen ist die Wegstrecke dabei wesentlich größer. Die Schäumung des Teilstücks verdeutlicht den enormen Druck des verbliebenen Kohlenstoffdioxids, denn nur so konnten die Bedingungen des Schäumungsprozesses ermöglicht werden. Das resultierende Teilstück weist eine interessante Schaumstruktur auf, die im Folgenden näher untersucht wurde, ebenso wie auch das zylindrische Innenstück. Daraufhin wurde das Element zersägt und strukturelle Parameter wie die Porosität erfasst. Die Volumina der untersuchten Teilstücke wurden geometrisch oder durch die Messung der Wasserverdrängung

bestimmt. Abbildung 50a zeigt das nach außen hin geschäumte Teilstück und zwei mit a und b gekennzeichnete Bereiche, die näher untersucht wurden.

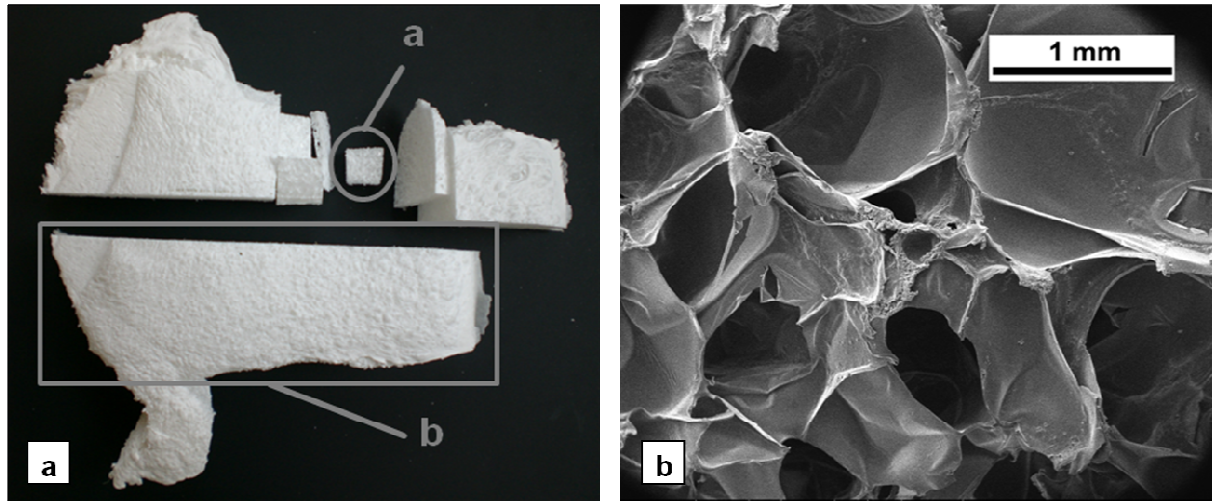


Abbildung 50: a) Abgetrenntes nach außen hin geschäumtes Teilstück. Das Teilstück wurde zur Untersuchung in mehrere kleine Elemente zersägt; b) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Schaumes aus dem Teilstück.

Das geschäumte Teilstück ist sehr leicht und deutet bereits auf eine hohe Porosität hin, die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme bei 81-facher Vergrößerung bestätigt diese Annahme. Das Material weist relativ große Poren auf, die in Abbildung 50b zu erkennen sind. Aus dem Teilstück wurde ein kleiner Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 10 mm sowie ein größeres Element (mit b in Abb. 50a gekennzeichnet) herausgetrennt. Die Porosität in dem Würfel beträgt 94 %. Das Volumen wurde hierbei durch die Abmessungen mathematisch ermittelt, bei dem größeren Stück wurde die Wasserverdrängung gemessen und dadurch das Volumen des Elements berechnet. Die Porosität in Element b beträgt 92 %. Dieser Vergleich zeigt, dass beide benutzten Methoden zur Bestimmung des Volumens zu ähnlichen Ergebnissen führen. Es ist jedoch zu beachten, dass es sich hierbei um grobe Näherungen handelt. Interessant ist die entstandene Schaumstruktur aufgrund ihrer hohen Porosität. Es stellt sich die Frage, ob daraus ein Potential für biomedizinische Anwendungen geschöpft werden kann. Weiterführende Untersuchungen zum freien Schäumen werden in Kapitel 5.7 vorgestellt. Über die mechanische Stabilität dieses Schaumes können bis heute allerdings noch keine quantitativen Aussagen getroffen

werden. Auffällig ist jedoch eine gewisse Stabilität beim Berühren des Materials. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Porositätsbestimmung zusammengefasst.

Tabelle 8: Berechnung der Porosität ausgewählter Elemente des Teilstücks.

Teilstück	Formkörper				Komposit
	Masse	Volumen	Rohdichte	Porosität	Reindichte
	m in g	V in cm ³	ρ_{Roh} in g cm ⁻³	ϕ in %	ρ_{Rein} in g cm ⁻³
Teilstück (a)*	0,08	1,00	0,08	94	1,37
Teilstück (b)**	7,80	71,00	0,11	92	

mit der Porosität ϕ aus $(1 - \rho_{\text{Roh}}/\rho_{\text{Rein}}) \cdot 100$, der Rohdichte (ρ_{Roh}) aus $m_{\text{Körper}}/V_{\text{Körper}}$, theoretischer Reindichte (ρ_{Rein}), berechnet aus den Dichten von Calcit und PDLLA

* Volumen durch gesägten Würfel mit ca. 10 mm Kantenlänge festgelegt.

** Volumen durch Wasserverdrängung des Formkörpers ermittelt.

Abbildung 51a zeigt die zwei Hälften des zylindrischen Innenstücks der Form, in Abbildung 51b wird die Schaumstruktur des nach außen hin geschäumten Teilstücks im Querschnitt dargestellt.

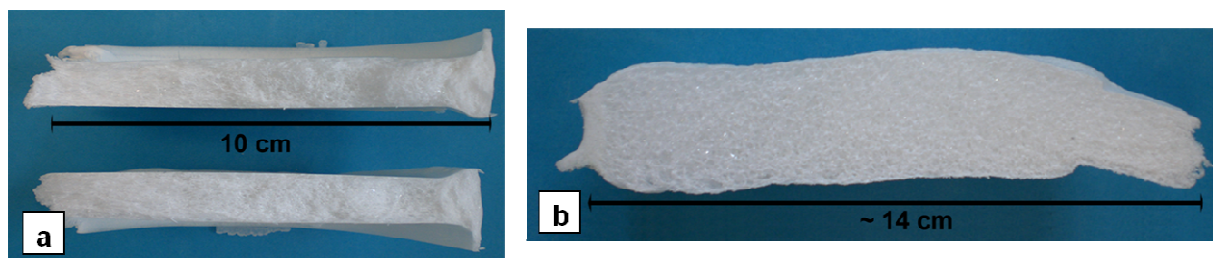


Abbildung 51: a) Geschäumtes, zylindrisches und in zwei Elemente zerteiltes Innenstück und b) explosionsartiges, nach außen hin geschäumtes Teilstück im Querschnitt.

Anschließend stellt sich die Frage, welche Auswirkungen dieser Schäumungsprozess auf die Porosität des zylindrischen Innenstücks gehabt hat. Hierzu wurde das Innenstück ebenfalls auf dessen Porosität hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Bestimmung finden sich in Tabelle 9. Die Porosität liegt, je nach Bestimmungsmethode, zwischen 64 % und 69 %. Das Volumen des zylindrischen

Innenstücks wurde einmal durch die Abmessungen der Form ausgerechnet und zum Vergleich mittels Wasserverdrängung bestimmt. Diese Werte zeigen, dass durch die Entweichung des Materials beim Schäumen nach außen hin auch die Porosität im zylindrischen Innenstück erhöht wurde.

Tabelle 9: Berechnung der Porosität des zylindrischen Innenstücks.

Innen- stück	Formkörper				Komposit
	Masse	Volumen	Rohdichte	Porosität	Reindichte
	m	V	ρ_{Roh}	Φ	ρ_{Rein}
	in g	in cm ³	in g cm ⁻³	in %	in g cm ⁻³
(a)*	40,1	81,34	0,49	64	1,37
(b)**		94,00	0,43	69	

mit der Porosität Φ aus $(1 - \rho_{\text{Roh}}/\rho_{\text{Rein}}) \cdot 100$, der Rohdichte (ρ_{Roh}) aus $m_{\text{Körper}}/V_{\text{Körper}}$, theoretischer Reindichte (ρ_{Rein}), berechnet aus den Dichten von Calcit und PDLLA

* Theoretisches Volumen durch Soll-Volumen der Form festgelegt.

** Volumen durch Wasserverdrängung des Formkörpers ermittelt.

Bei diesem Unfallexperiment wurde ein haptisch, stabiles Teilstück mit hoher Porosität erhalten, das aufgrund der interessanten Schaumstruktur ein hohes Potential für weitere Experimente verspricht.

5.5.2. Homogene Porosität großvolumiger Probenkörper

Dass generell auch größere Implantate durch das Begasungsverfahren hergestellt werden können, soll im folgenden Abschnitt gezeigt werden. Entscheidend bei der Umsetzung des Schäumungsverfahrens und der Übertragung in industrielle Prozesse ist die Wahl des Formmaterials. PTFE ist permeabel für Kohlenstoffdioxid und ermöglicht so die Diffusion des Gases in die Form und während der Dekompression aus der Form heraus. Dennoch ist die Diffusion relativ langsam und kann gerade bei großen Formkörpern zu unerwünschten Komplikationen wie dem Nachschäumen des Materials beim Öffnen der Form führen. Im vorherigen Abschnitt wurde eine Form verwendet, die sowohl aus PTFE als auch aus porösem Aluminium bestand. Für die Bereitstellung der großvolumigen Formen war die Firma Karl Leibinger Medizintechnik GmbH & Co. KG maßgeblich verantwortlich. Es wurden im Projekt auch Formen komplett aus porösem Aluminium oder komplett aus PTFE verwendet. Makroporöses Aluminium hat den Vorteil, dass eine schnelle Diffusion

des Kohlenstoffdioxids in die Form ermöglicht wird, da die Poren deutlich größer als beim PTFE-Material sind. Grundsätzlich können die Deckflächen der Form mit Teflonfolien beklebt werden, um ein späteres Anhaften des Formkörpers an der Form zu verhindern und eine sichere Entnahme zu ermöglichen. Abbildung 52 zeigt die homogene Porositätsverteilung in einem großvolumigen, zylindrischen Formkörper, der in einer makroporösen Aluminiumform mit einer 50-prozentigen Porosität unter bekannten Begasungsparametern aufgeschäumt wurde. Hierzu wurde das UniDuE-Komposit mit einer Dichte von $1,37 \text{ g cm}^{-3}$ verwendet. Es sollte also grundsätzlich möglich sein, größere Implantate aus einem Kompositmaterial mit PDLLA und Calcit herzustellen.

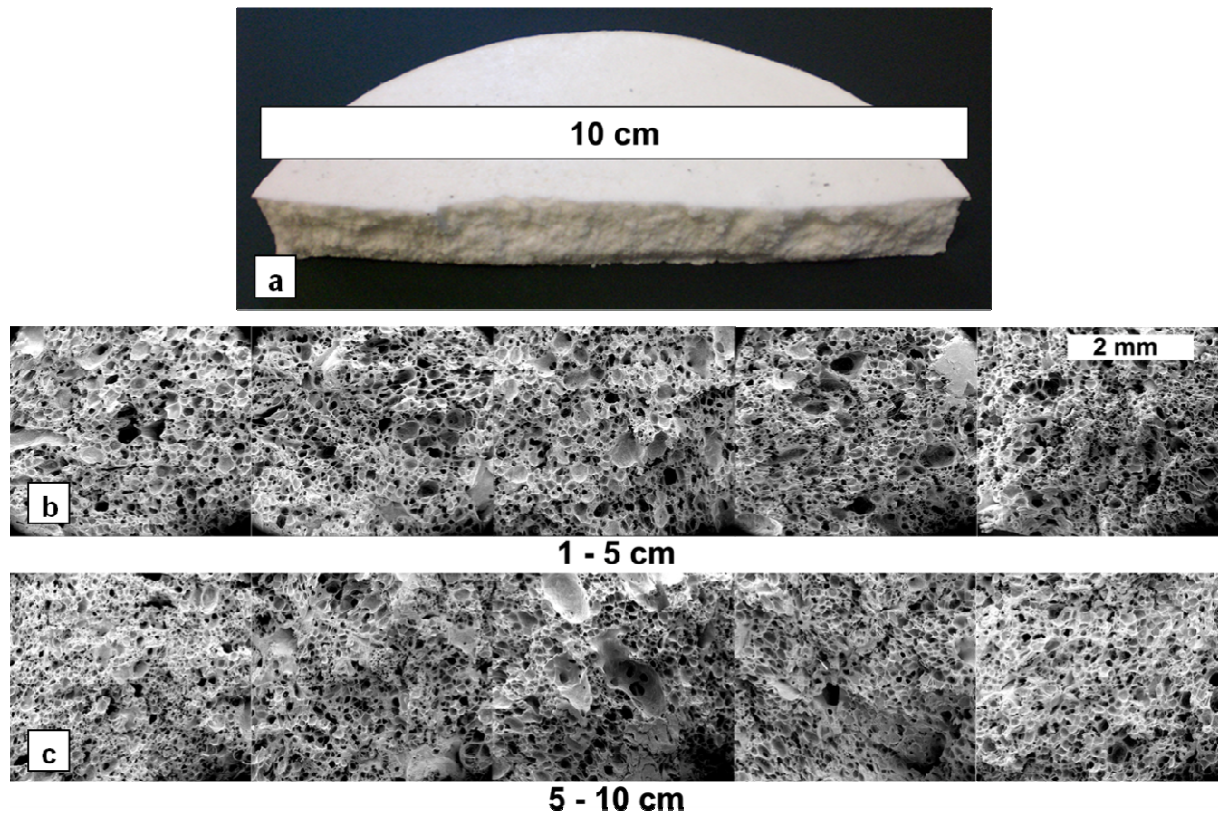


Abbildung 52: Großvolumiger Formkörper im Querschnitt, der aus dem UniDuE-Komposit in einer porösen Aluminiumform aufgeschäumt wurde. Deutlich zu erkennen ist die homogene Porosität, die sich durch den kompletten Formkörper zieht.

Der gesamte Formkörper wurde vollständig aufgeschäumt, dabei ist kein Porositätsgradient im Material entstanden. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die spätere Fertigung von geometrisch individuellen Implantaten.

5.5.3. Abhängigkeit der Porosität vom Hohlformmaterial

Bei der Verwendung unterschiedlicher Hohlformmaterialien stellt sich allerdings die Frage, ob der Werkstoff der Form einen Einfluss auf den Formkörper hat oder ob die Schaumstruktur durch sie verändert wird. In diesem Kapitel soll der Einfluss des Hohlformmaterials auf die Porosität untersucht werden. Besonders auffällig waren die Deformationen, die bedingt durch den Schäumungsprozess an den Formen zu Auswölbungen führten. Zur Stabilisierung der Formen können Stahlplatten verwendet werden, die jeweils von oben und von unten zu einer Stabilisierung der Form während der Begasung beitragen (vgl. Kap. 5.5.1). Diese Flächen sind dann allerdings nicht mehr für die Diffusion des Kohlenstoffdioxids zugänglich. Die Diffusion erfolgt dann nur über die Mantelflächen der Form. Die hier gezeigten zylindrischen Formkörper wurden jeweils einmal in einer PTFE-Form und einmal in einer makroporösen Aluminiumform ohne Stahlplatten unter den bekannten Schäumungsparametern mit dem UniDuE-Komposit aufgeschäumt. Abbildung 56 zeigt die beiden Formkörper im Querschnitt.

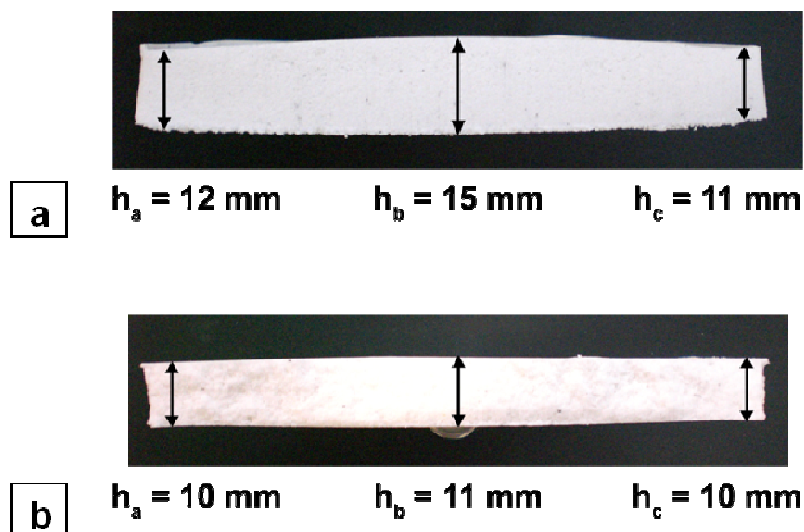


Abbildung 53: Großvolumiger Formkörper im Querschnitt: a) in einer PTFE-Form und b) in einer makroporösen Aluminiumform aufgeschäumt.

Der Formkörper in Abbildung 53b entspricht dabei dem Formkörper aus Abbildung 52. Die Geometrie wird durch die Form vorgegeben und dennoch ist die Höhe der Implantatkörper nicht überall gleich. Infolge des Schäumungsprozesses kommt es zu einer Expansion des Schaumes in der PTFE-Form, die zu einer Deformation des Formkörpers führt, wie in Abbildung 53a zu erkennen ist. Auch in der Aluminiumform kommt es zu einer Expansion des Schaumes, die sich aber nicht so stark in den Abmessungen des Formkörpers widerspiegelt. Dennoch kam es infolge dieser Expansion zur Rissbildung in der oberen Aluminiumplatte der Form. Der Formkörper aus der PTFE-Form weist in der Mitte eine stärkere Expansion in z-Richtung auf als am Rand. Um dies abzumildern, sollten also Stahlplatten zur Stabilisierung der Form verwendet werden. Diese Abweichung der Probeform könnte zu einer veränderten Struktur im Material führen. Ob dies der Fall ist und ob das Hohlformmaterial einen Einfluss auf die Porosität hat, wurde durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen untersucht. Abbildung 54 zeigt die Schaumstruktur des in der makroporösen Aluminiumform aufgeschäumten UniDuE-Komposits bei a) 70-facher Vergrößerung und b) bei 280-facher Vergrößerung. Abbildung 55 zeigt das gleiche Komposit aus der PTFE-Hohlform bei a) 76-facher Vergrößerung und b) bei 150-facher Vergrößerung.

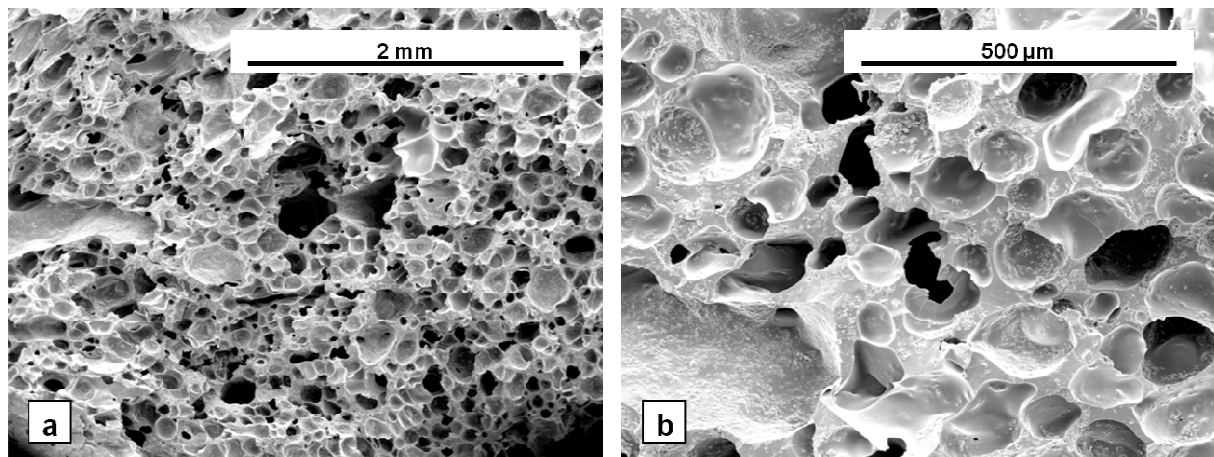


Abbildung 54: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Schaumstruktur des UniDuE-Komposits nach dem Begasen in einer makroporösen Aluminiumform.

Erfreulicherweise finden sich keine eklatanten Unterschiede in der Schaumstruktur, die Porengröße und die Porendichte sind bei beiden Implantatkörpern annähernd gleich. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für die spätere Umsetzung im

größtechnischen Maßstab. Hier ist es vorteilhaft, unterschiedliche Hohlformmaterialien zur Auswahl zu haben, um bei der Umsetzung eine größere Flexibilität zu gewährleisten.

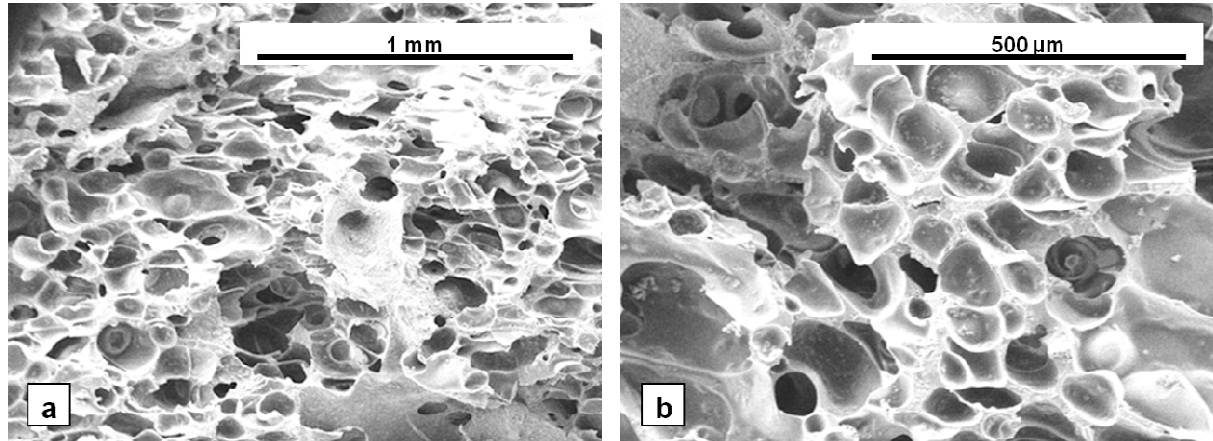


Abbildung 55: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Schaumstruktur des UniDuE-Komposits nach dem Begasen in einer PTFE-Form.

5.6. Generierung von Porosität im Kompositmaterial

Poröse Materialien sind in unterschiedlichsten Fragestellungen und Anwendungen von entscheidender Bedeutung, insbesondere im werkstoffwissenschaftlichen Kontext der Biomaterialentwicklung. Das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte physikalische Aufschäumen von Polymeren, wie dem PDLLA mit überkritischem Kohlenstoffdioxid, erzeugt geschlossenhellige Polymerschäume. Hierbei ist der überwiegende Anteil der Poren im Material isoliert. Diese Art von Porosität führt zu einer deutlichen Gewichtsersparnis der Implantate und letztendlich auch zu einer Kostenersparnis. Auch die Festigkeit bzw. Steifigkeit des Materials kann gewahrt werden. Aus biologischer Sicht ist aber eine knöcherne Rekonstruktion gewünscht, welche das Einwachsen von Knochenzellen und die Vaskularisierung des Implantates voraussetzt. Hierbei dient die *Spongiosa* des Knochens mit ihrer Porosität, die einen ungehinderten Stofftransport innerhalb des Knochens ermöglicht, als Vorbild. Eine Herausforderung stellt die Realisierung dar, denn neben der Architektur des porösen Systems spielen die mechanischen Eigenschaften eine wichtige Rolle. Generell stellt sich die Frage, welche technischen Möglichkeiten verwendet werden können, um die Porosität im Material zu erhöhen. Um ein geschlossenhelliges Schaumsystem in ein interkonnektierendes Porensystem zu

überführen, kann das Begasungsverfahren mit dem Porogenverfahren kombiniert werden. Als Porogene kommen biologisch unbedenkliche Substanzen in Betracht, wie beispielsweise Natriumchlorid, Fasern aus Polyvinylalkohol oder Saccharose, die nach dem Aufschäumungsprozess mit Wasser wieder aus dem Material ausgewaschen werden und so Hohlräume im Formkörper hinterlassen.^[84] Dieser Prozess kommt auch bei Keramiken zum Einsatz, die durch Pressverfahren zu Formkörpern verarbeitet werden.^[184] Der Einsatz von Natriumchlorid als Porogen mit der Kombination des Schäumungsverfahrens, wurde am UniDuE-Komposit von SCHILLER bereits untersucht.^[57] Von ANNEN wurde das Konzept weiterverfolgt, indem submikrometergroße Porogenpartikel aus Natriumchlorid für die Erzeugung von hierarchisch porösen Kompositschäumen verwendet wurden.^[71] Das Verfahren hat sich zur Erzeugung interkonnektierender Systeme etabliert und führt zu interessanten Strukturen innerhalb des Materials. Im BMBF-Projekt wurden bioaktive Implantate angestrebt, die durch inkorporierte Wachstumsfaktoren mit osteoinduktiven Eigenschaften ausgestattet werden sollen. Es stellt sich die Frage, inwieweit das Porogenverfahren in die Fertigung von Individualimplantaten implementiert werden kann. Aus verfahrenstechnischer Sicht kann es hierbei zu Problemen kommen, denn die einzelnen Wachstumsfaktoren werden dem Kompositmaterial vor dem physikalischen Schäumungsprozess zugesetzt. Erfolgt nun das Auswaschen des Porogens im Anschluss an die Begasung, so werden neben dem Porogen auch die Wachstumsfaktoren in unbekanntem Ausmaß mit herausgelöst. Dieser Vorgang ist unter wirtschaftlichen und funktionellen Aspekten bedenklich. Daher wurde das Porogenverfahren im BMBF-Projekt nicht weiter verfolgt. Aus Gründen der generellen Machbarkeit wurden aber aus rein wissenschaftlichem Interesse Versuche zur Kombination des Begasungsverfahrens mit dem Porogenverfahren unter Verwendung der neuen Kompositmaterialien durchgeführt.

In der Literatur werden unterschiedliche Möglichkeiten zur Erzeugung von Porosität diskutiert. Beispielsweise wird ein Verfahren beschrieben, bei dem selbst PLLA durch ein Gemisch aus Kohlenstoffdioxid und Aceton bei hoher Temperatur mit Porengrößen im Bereich von 5 bis 400 µm aufgeschäumt wird.^[74] Für die Verarbeitung von Kompositen mit Wachstumsfaktorbeladung müssen aber andere Methoden ins Auge gefasst werden. Die Porosität im aufgeschäumten Material ist auch von der Einwaage abhängig. Wird die Einwaage an Kompositmaterial reduziert,

erhöht sich im Idealfall auch die Porosität. Es kann aber nur durch empirische Studien ermittelt werden, bis zu welchem Punkt vollständig geschäumte Formkörper erhalten werden können. Durch die Materialersparnis könnten gleichzeitig Kosten eingespart werden, außerdem würden die dünneren Porenwände eine schnellere Degradation begünstigen. Somit würde innerhalb des *scaffold* relativ schnell ein offenporiges System entstehen, welches die Neubesiedelung mit Knochenzellen forcieren würde. Dennoch darf die Stabilität nicht außer Acht gelassen werden.

5.6.1. Variation des Porositätsgrades ohne Porogenzusatz

Im umgekehrten Fall lässt sich die Porosität natürlich auch durch mehr Materialeinwaage reduzieren, bis schließlich kompakte Formkörper entstehen. Die Schwierigkeit besteht aber darin, festzustellen, inwieweit die Porosität unter Erhalt der Integrität der Formkörper durch die Reduktion von Kompositmaterial gesteigert werden kann. Die Porosität kann theoretisch berechnet werden, wenn das Volumen der Form und die Dichte des Komposits bekannt sind. Voraussetzung dafür ist die Annahme, dass die komplette Form homogen durch den Schäumungsprozess ausgefüllt wird. Bisher wurden durch Begasung der Komposite Formkörper mit 50-prozentiger Porosität hergestellt. Diese Formkörper zeigen ein ideales Schäumungsverhalten. An dieser Stelle soll untersucht werden, ob durch Reduktion der Materialeinwaage qualitativ gleichwertige Formkörper mit höherer Porosität erhalten werden können. Diese Methode wäre auch mit der Wachstumsfaktorbeladung in Einklang zu bringen. Es wurden drei theoretische Porositätsgrade von 55 %, 60 % und 65 % für die Versuche festgelegt. Hierzu wurden die rechteckigen Formen, die auch für die Probekörper der Dreipunktbiegung benutzt wurden, mit den entsprechenden Mengen Komposit beladen. Da diese Untersuchungen zu Beginn des Projektes durchgeführt wurden, standen die neuen Kompositmaterialien noch nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden die Versuche, die zu den gezeigten Ergebnissen geführt haben, mit dem UniDuE-Komposit durchgeführt. Da das Schäumungsverhalten jedoch ähnlich war, kann grundsätzlich untersucht werden, inwieweit sich das Schäumungsverhalten ändert. Die Proben wurden dann bei 37 °C und einem Druck von 100 bar Kohlenstoffdioxid für zwei Stunden begast und anschließend mit 5 bar min⁻¹ auf Umgebungsdruck dekomprimiert. Nach einer Standzeit von mehreren Stunden wurden die Formkörper entnommen. In den folgenden Abbildungen werden die einzelnen Versuche

dargestellt. Abbildung 56 zeigt die Formkörper mit einer theoretischen Porosität von 65 %.

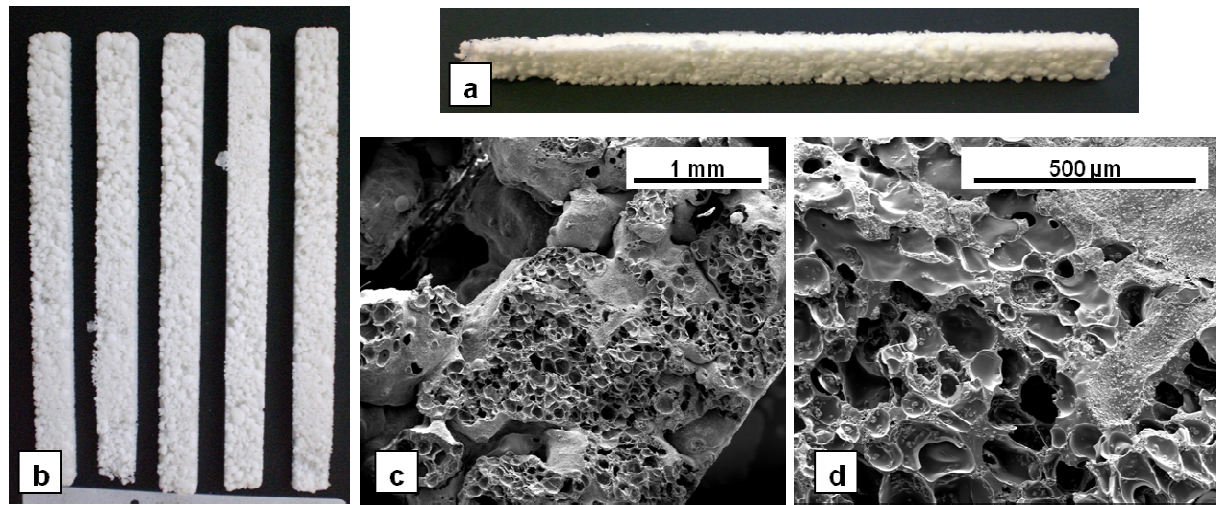


Abbildung 56: Aufgeschäumte Probekörper mit einer theoretischen Porosität von 65 %: a) und b) makroskopisches Schäumungsverhalten der Probekörper c) und d) rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des geschäumten Komposits.

Abbildung 56a verdeutlicht, dass die Form durch den Schäumungsprozess nicht komplett ausgefüllt wurde. Rein makroskopisch zeigen die einzelnen Formkörper eine nicht zufriedenstellende körnige und inhomogene Morphologie. Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zeigt ansatzweise die bekannte Schaumstruktur, aber auch zerklüftete, raue Bereiche mit gradiertem Schäumungsverhalten und inhomogener Struktur. Die unvollständige Schäumung führt in diesem Fall zu keiner erhöhten Porosität. Betrachtet man die Porengröße, so liegt diese im Bereich von ca. 250 µm oder kleiner, im Gegensatz zu einer Porengröße zwischen 200 µm und 400 µm bei einer 50-prozentigen Porosität. Abbildung 57 zeigt die Formkörper mit einer theoretischen Porosität von 60 %. Das Ergebnis ähnelt den Formkörpern mit einer Sollporosität von 65 %. Makroskopisch sind die Formkörper etwas homogener aufgeschäumt, die einzelnen Kompositkörner sind dabei allerdings noch zu erkennen. In der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme zeigt sich eine leicht erhöhte Größe der einzelnen Poren, es zeigt sich aber auch wieder ein deutlicher Gradient der Schäumungsqualität im Material. Einzelne Bereiche der Probe sehen hingegen homogen aus. Zum Abschluss werden

die Formkörper mit einer theoretischen Porosität von 55 % in Abbildung 58 dargestellt.

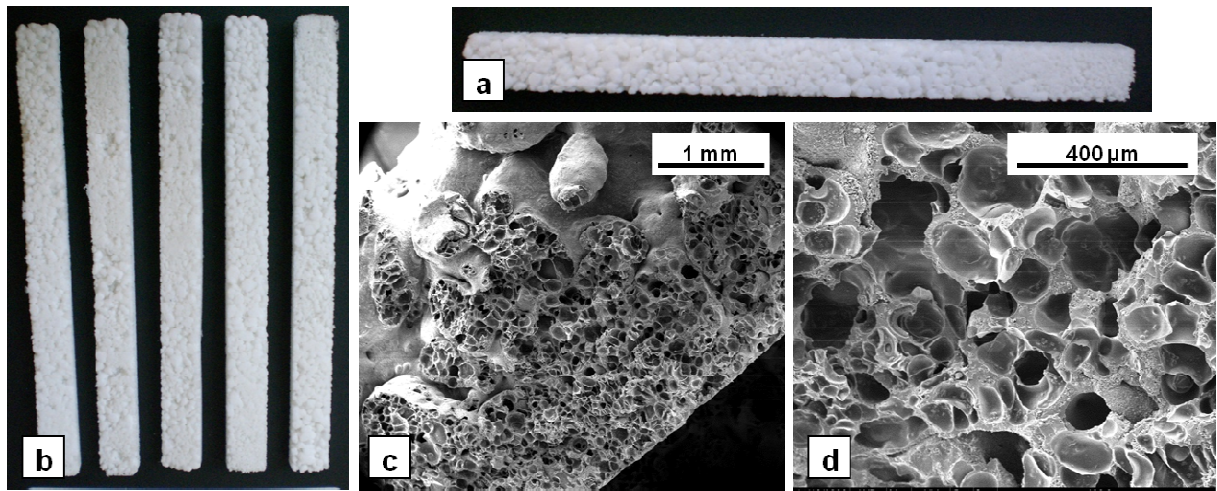


Abbildung 57: Aufgeschäumte Probekörper mit einer theoretischen Porosität von 60 %: a) und b) makroskopisches Schäumungsverhalten der Probekörper c) und d) rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des geschäumten Komposits.

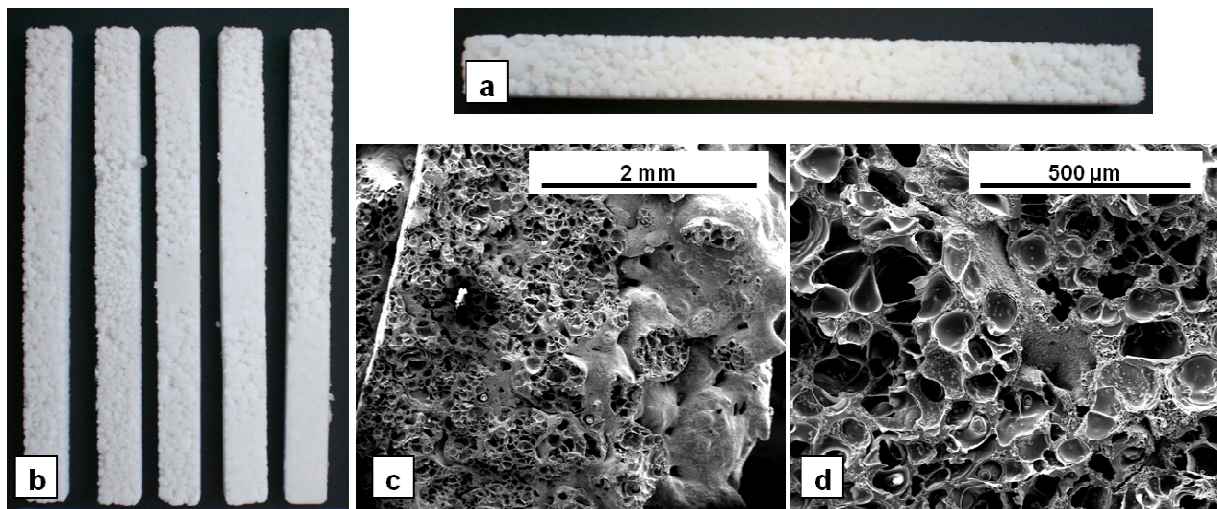


Abbildung 58: Aufgeschäumte Probekörper mit einer theoretischen Porosität von 55 %: a) und b) makroskopisches Schäumungsverhalten der Probekörper c) und d) rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des geschäumten Komposits.

Makroskopisch sind die Formkörper etwas homogener geschäumt, allerdings ist die Struktur immer noch körnig. Die Schaumstruktur zeigt auch hier einen deutlichen Gradient im Material. Hierdurch kann gezeigt werden, dass sich aus einem

Kompositmaterial aus PDLLA und Calcit mit der Zusammensetzung 80:20 unter den vorgestellten Prozessparametern keine definierten Formkörper mit entsprechender Qualität herstellen lassen. Aufgrund der reduzierten Materialeinwaage kommt es beim Schäumungsprozess zu einer instabilen Schaumstruktur, die während der Dekompression in sich kollabiert.

5.6.2. Generierung von Porosität durch Porogene

In diesem Abschnitt wird untersucht, ob sich in dem neuen 80:20-Kompositmaterial durch etablierte Porogenverfahren höhere Porositätsgrade realisieren lassen. Der Hauptunterschied besteht auf verfahrenstechnischer Seite, das UniDuE-Komposit wird durch ein lösemittelbasiertes Verfahren hergestellt (vgl. Kap.4.1.1). Bei diesem Prozess können die Porogenpartikel mit der keramischen Phase während der Herstellung zusammen dispergiert werden, daraus resultiert eine homogene Verteilung innerhalb des Materials. Im Falle des 80:20-Komposits handelt es sich um ein fertig compoundiertes Komposit, bei dem die einzelnen Porogenpartikel auf eine andere Art mit dem Material vermischt werden müssen. Hier bietet sich ein mechanisches Mischen an. In Tabelle 10 sind die untersuchten Porogene dargestellt, die für die folgenden Experimente benutzt wurden.

Tabelle 10: Verwendete Porogene zur Porositätsgenerierung im 80:20 Komposit.

Porogene
1) NaCl-Kristalle (63-90 µm)
2) NaCl-Kristalle (250-400 µm)
3) Saccharose-Kristalle (500-1000 µm)
4) Saccharosefasern
5) Polyvinylalkoholfasern (PVA)
6) Saccharosefasern in Kombination mit NaCl-Kristallen (63-90 µm)
7) Polyvinylalkoholfasern (PVA) in Kombination mit NaCl-Kristallen (63-90 µm)

Bei den Natriumchlorid-Kristallen handelt es sich um ein handelsübliches Produkt, durch fraktionierende Siebfunktion mit einem Prüfsieb nach DIN 4188 konnte eine zweite und damit kleinere Partikelfraktion erhalten werden. Die Saccharose-Kristalle und die Polyvinylalkoholfasern waren ebenfalls kommerziell erhältlich. Die Saccharosefäden wurden selbst hergestellt, indem Saccharose-Kristalle durch

Wärmezufuhr geschmolzen und anschließend mit einem Glasstab zu Fasern mit variablem Durchmesser gezogen wurden. Die Vermengung erfolgte durch mechanisches Mischen des 80:20-Komposits mit den entsprechenden Mengen Porogen, die Schäumungsparameter bleiben wie bereits beschrieben (100 bar CO₂, 2 h Begasung bei 37 °C, Dekompression mit 5 bar min⁻¹). Nur die PVA-Fasern und die Saccharosefasern wurden von Hand mit dem Kompositmaterial zusammen in die Form „gestapelt“. Eine grundsätzliche Frage ist, wie viel Porogen dem Kompositmaterial zugesetzt werden kann, so dass es immer noch zufriedenstellend aufschäumt. Dieses Problem wurde von SCHILLER untersucht.^[57] ANNEN hat daraufhin untersucht, inwieweit diese Mischungsverhältnisse auf submikrometergroße Natriumchloridkristalle zu übertragen sind.^[71] Anhand beider Vorüberlegungen wurde ein Volumenverhältnis von 60:40 (Komposit:Porogen) gewählt. Als Porogen kommen nur größere Partikel ab 63 µm zur Anwendung. Das Kompositgemisch bestehend aus PDLLA, Calcit und Porogen wurde zu einer Gesamtporosität von 40 % aufgeschäumt. Nach dem Auswaschen des Porogens aus den aufgeschäumten Formkörpern, entsteht eine theoretische Porosität von 64 %. Dazu wurden die Formkörper in warmem Reinstwasser für 24 Stunden und länger inkubiert. Der Ansatz wurde bewusst so gewählt, um nicht durch noch höhere Porosität ein unzureichendes Schäumungsverhalten zu bewirken. Die angestrebte Zielporosität von 64 % gilt für den Zusatz von Saccharose und Natriumchlorid. In den Fällen, in denen zusätzlich PVA- bzw. Saccharosefasern verwendet wurden, dienten sie zu einer Art Kanalbildung innerhalb der Formkörper. Dadurch dürfte die Porosität noch etwas gesteigert werden und einzelne Hohlräume untereinander besser verbunden werden. Quantitativ lässt sich die Porosität dieser Systeme nur schlecht erfassen, da einzelne 1 cm lange PVA-Stücke bzw. 1 cm bis 3 cm lange Saccharosefasern von Hand beim Befüllen der Form nach eigenem Ermessen im Material verteilt wurden. In den Fällen, wo nur PVA-Fasern oder Saccharosefasern als Porogen benutzt wurden, wurde die Einwaage an Komposit wie bei einer 50-prozentigen Porosität berechnet und die Fasern in die Berechnung nicht mit einbezogen. Für die Einwaagen der einzelnen Komponenten wurden folgende Dichten benutzt: 80:20-Komposit 1,37 g cm⁻³, Natriumchlorid 2,16 g cm⁻³ und Saccharose 1,59 g cm⁻³. Das Volumen der Form betrug 2,88 cm³ und entspricht den rechteckigen Hohlformen, die auch für die Herstellung der Formkörper für die Dreipunktbiegeversuche verwendet wurden.

Von TADIC *et al.* wurde ebenfalls eine Methode beschrieben, bei der Natriumchlorid und Polyvinylalkoholfasern als Porogene zur Herstellung von porösen Calciumphosphatkeramiken verwendet wurden.^[184, 261] Hierbei wurden Formkörper durch kaltisostatisches Pressen von Carbonatapatit und Porogen hergestellt, die ihre poröse Struktur nach dem Auswaschen der entsprechenden Porogene erhielten. Von SCHWARZ *et al.* wurde ein Verfahren zur Erzeugung von hierarchisch strukturiertem Polyglycolid beschrieben, auch hier spielt Natriumchlorid als Porogen eine Rolle.^[262] Ein interessanter Ansatz zur Herstellung interkonnektierender PLLA-*scaffolds* wurde von GHOSH *et al.*, bei dem Natriumchlorid und Polyethylenoxid als Porogen zum Einsatz kommen, beschrieben.^[87] Es konnten Porositätsgrade von 76 % bis 86 % generiert werden. Insgesamt ist das Porogenverfahren somit sehr flexibel und kann mit diversen Pressverfahren, Festkörperreaktionen und Begasungsverfahren kombiniert werden. Die folgenden Experimente zeigen einige repräsentative Aufnahmen der im 80:20-Komposit durch Porogene generierten Porosität. Alle sieben Ansätze aus Tabelle 10 konnten zu homogen aufgeschäumten Formkörpern umgesetzt werden. Die Struktur und Porosität der einzelnen Ansätze wurde im Näheren durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen charakterisiert. Abbildung 59 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des 80:20-Komposits mit a) 63 bis 90 µm großen Natriumchloridkristallen und PVA-Fasern bei 200-facher Vergrößerung und b) mit Saccharosefasern bei 252-facher Vergrößerung.

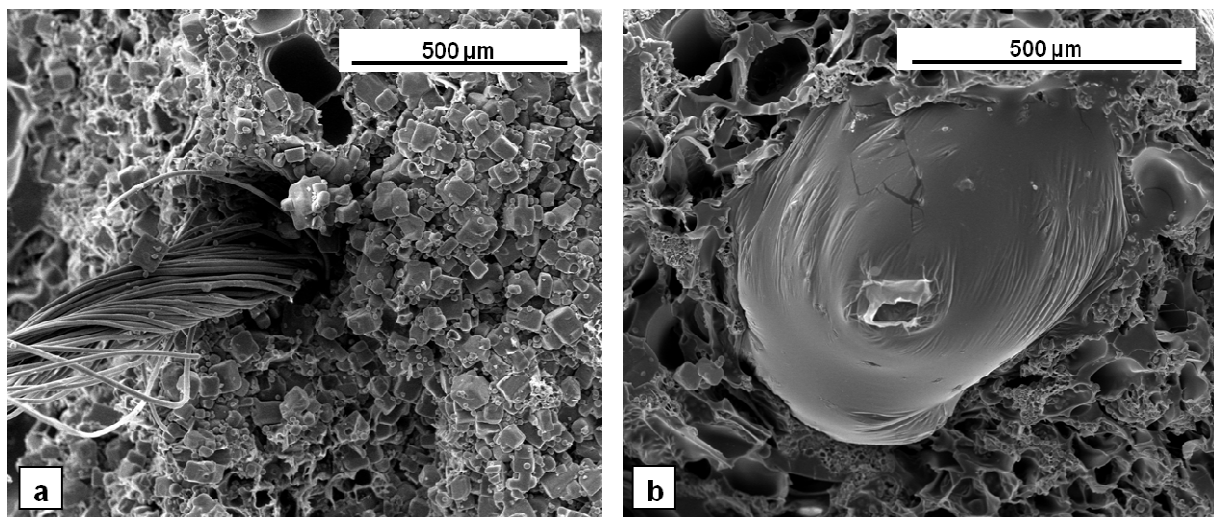


Abbildung 59: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des geschäumten 80:20-Kompositmaterials mit inkorporierten Porogenen vor dem Auswaschen: a) NaCl-Kristalle (63-90 µm) und PVA-Fasern und b) Saccharosefasern.

In Abbildung 59a erkennt man in der Mitte eine verdrehte PVA-Faser, die aus der Bruchfläche hinaus ragt, des Weiteren sind die in der Polymermatrix eingebetteten Natriumchloridkristalle zu erkennen. Abbildung 59b zeigt die Bruchfläche des aufgeschäumten Kompositmaterials mit einer Saccharosefaser in der Mitte der Aufnahme. Diese Faser kann nach ihrer Herauslösung mit Wasser zu einer Kanalbildung innerhalb der geschäumten Struktur führen und somit eine weitere Hierarchieebene in der Porosität generieren, gleiches gilt für die PVA-Fasern. Im Idealfall könnte somit eine erhöhte Porosität durch die entfernten Natriumchloridkristalle bzw. Saccharosekristalle im Material entstehen, wobei die einzelnen Poren wiederum durch Kanäle der entfernten PVA-Fasern bzw. Saccharosefasern miteinander im Sinne einer Interkonnektion verbunden sind.

5.6.3. Geschäumte Kompositmaterialien nach der Porogenentfernung

Nach dem Auswaschen der Porogene stellt sich die Frage nach der Struktur des Materials. Ein natürliches Abbild der *Spongiosa* des Knochens kann nicht ohne Weiteres geschaffen werden, dennoch kann man versuchen, das technisch Mögliche zu realisieren, um einen hohen Porositätsgrad im Material zu erreichen. Nachfolgend sind einige repräsentative und ausgewählte Beispiele dargestellt. Abbildung 60 zeigt das 80:20-Komposit nach dem Auswaschen der 63 μm bis 90 μm großen Natriumchloridkristalle bei a) 500-facher Vergrößerung und b) 1000-facher Vergrößerung.

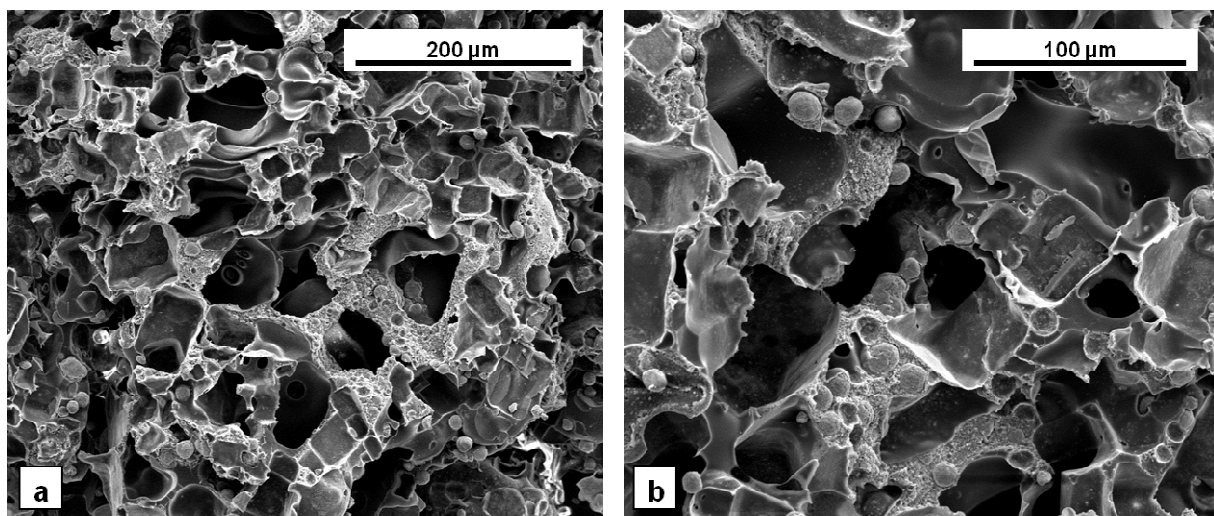


Abbildung 60: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des 80:20-Komposits nach dem Auswaschen der 63 bis 90 μm großen Natriumchloridkristalle.

Deutlich zu erkennen ist ein hoch poröses System. Die bekannte Porenmorphologie des 80:20-Komposits mit 50 % Porosität ist hier nicht zu erkennen. Die Morphologie der Poren ist geprägt durch die Form und Größe der Natriumchloridkristalle. Neben diesen Poren zeigen sich auch kleinere sphärische Poren. Es fällt auf, dass die Größe der einzelnen Poren gegenüber der 50-prozentigen Porosität ohne Porogen leicht reduziert ist und damit eher im Bereich der Porogengröße liegt. Die Porosität und Struktur des Formkörpers zeigen eine homogene isotrope Beschaffenheit. Da die Formkörper vollständig aufgeschäumt werden konnten, sollte die theoretische Porosität von 64 % erreicht worden sein. Abbildung 61 zeigt das aufgeschäumte 80:20-Komposit nach dem Auswaschen der 250 bis 400 µm großen Natriumchloridkristalle bei a) 180-facher Vergrößerung und b) bei 200-facher Vergrößerung.

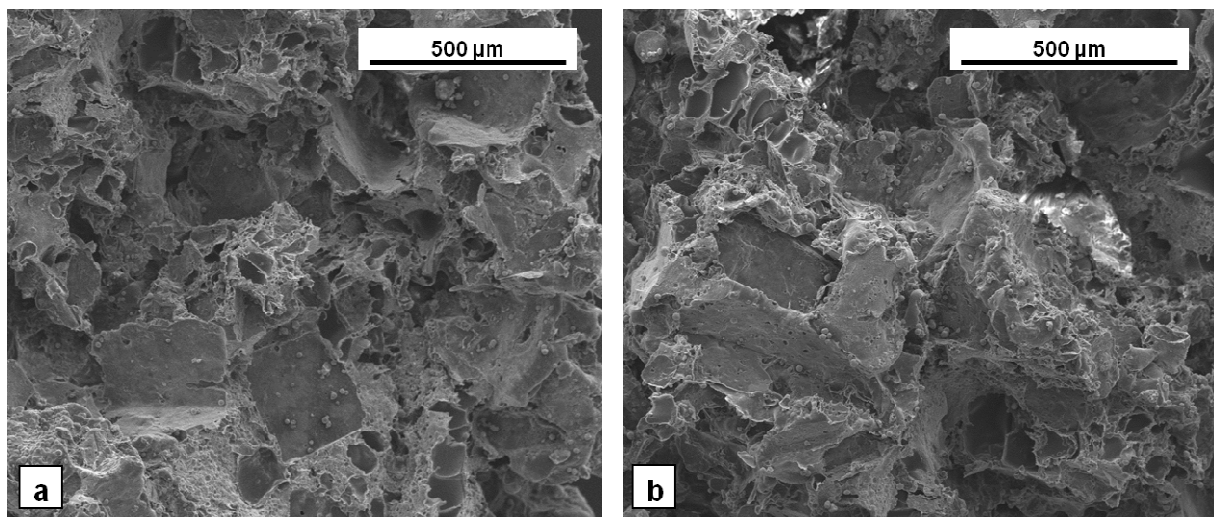


Abbildung 61: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des 80:20-Komposits nach dem Auswaschen der 250 bis 400 µm großen Natriumchloridkristalle.

Auch diese Formkörper konnten vollständig in der Hohlform aufgeschäumt werden. Die Struktur zeigt dennoch ein anderes Bild als bei den kleineren Natriumchloridkristallen. Morphologisch sind die einzelnen Poren deutlich als ein Abbild der Porogenkristalle zu erkennen, insbesondere fallen die glatten Flächen innerhalb der entstandenen Kavitäten auf. Die Größe der Poren ist gegenüber den kleineren Natriumchloridkristallen naturgemäß größer. Die Struktur und Porosität zeigt aber wieder ein homogenes isotropes Verhalten über den ganzen Formkörper. Neben den großen Poren erkennt man vereinzelte, kleinere sphärische Blasen.

Abbildung 62 zeigt das aufgeschäumte 80:20-Komposit nach dem Auswaschen der 500 bis 1000 μm großen Saccharosekristalle bei a) 200-facher Vergrößerung und b) bei 160-facher Vergrößerung.

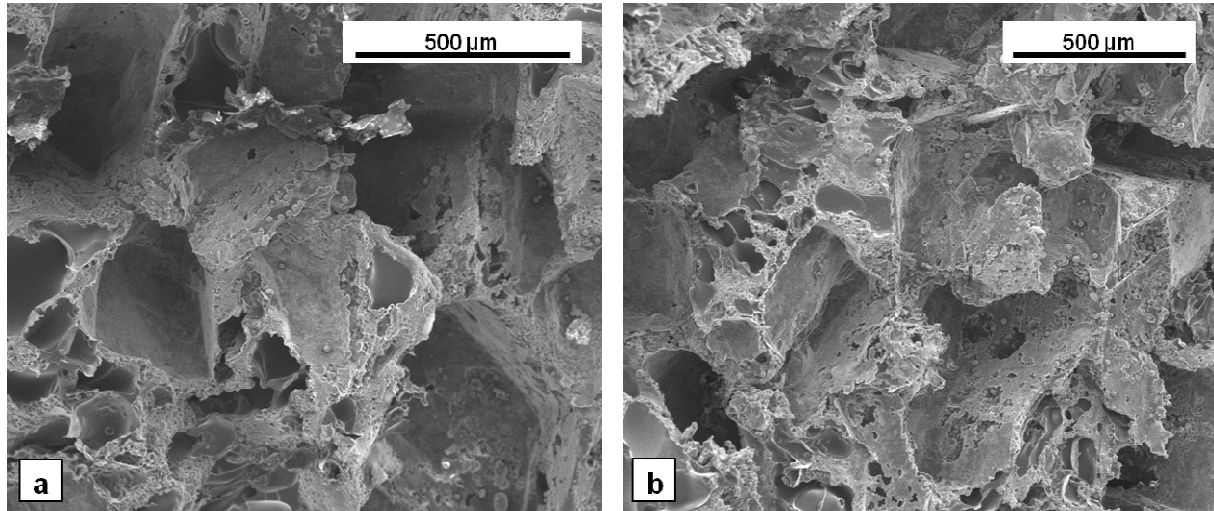


Abbildung 62: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des 80:20-Komposits nach dem Auswaschen der 500 bis 1000 μm großen Saccharosekristalle.

Bei Verwendung der Saccharosekristalle als Porogen, konnten ebenfalls vollständig aufgeschäumte Formkörper mit einer theoretischen Porosität von 64 % erhalten werden. Die Struktur des Materials ähnelt derer, die durch die Verwendung der 500 bis 100 μm großen Natriumchloridkristalle generiert werden konnte. Aufgrund der größeren Porogenform sind die einzelnen Poren in ihrem Durchmesser allerdings erhöht. Neben den großen Kavitäten finden sich wieder einzelne, kleinere Bläschen in der Gerüststruktur. Subjektiv wirkt das System aus struktureller Sicht poröser, als das durch die größeren Natriumchloridkristalle hergestellte. Insgesamt ist die Porosität und Struktur des gesamten Formkörpers auch in diesem Fall durch eine homogene, isotrope Beschaffenheit geprägt.

Abbildung 63 zeigt das aufgeschäumte 80:20-Komposit nach dem Auswaschen der a) Saccharosefasern bei 44-facher Vergrößerung und b) der PVA-Fasern bei 160-facher Vergrößerung. In Abbildung 63a erkennt man eine runde Öffnung im Querschnitt des geschäumten 80:20-Komposits, hier ist ein Kanal innerhalb der porösen Struktur entstanden. Im Falle der PVA-Fasern zeigt sich ein anderes Bild. Hier konnten die verwendeten PVA-Fasern nicht vollständig aus dem Material ausgewaschen werden, wie in Abbildung 63b zu erkennen ist. Einzelne aufgedrillte

Bestandteile einer PVA-Faser sind zu sehen. Die Fasern quellen im Kontakt mit Wasser sehr stark auf und bilden eine Art Gel.

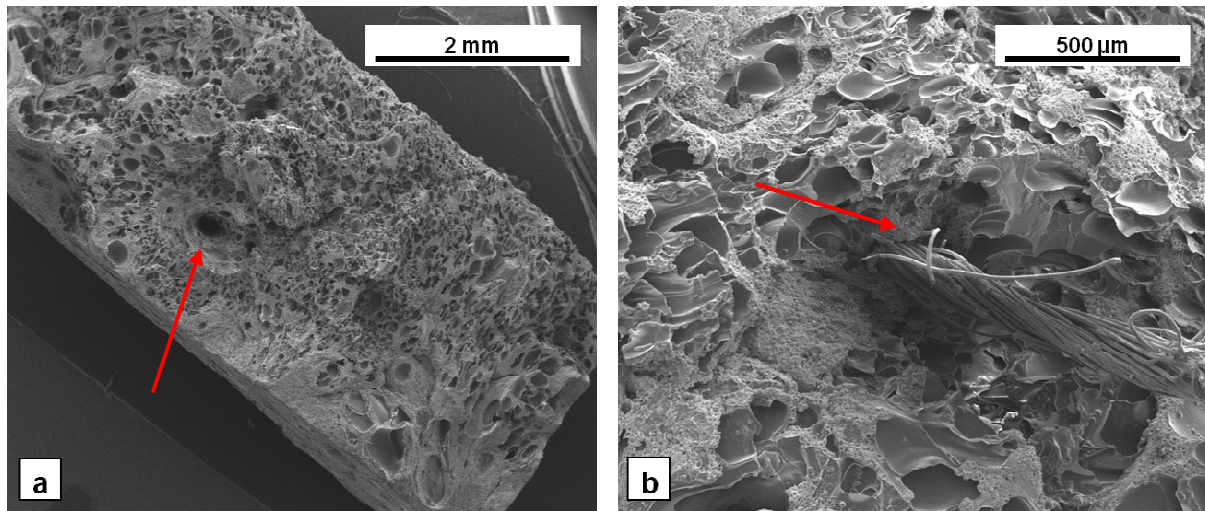


Abbildung 63: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des 80:20-Komposits nach dem Auswaschen der a) Saccharosefasern und b) der PVA-Fasern.

SCHWARZ konnte bei der Verwendung von PVA-Fasern als Porogen eine Fraktur in einem gepressten Polyglycolid-Pellet registrieren.^[263] Hier kam es aufgrund des Quellverhaltens zu einer „Sprengung“ des Polymerkörpers. In diesem Zusammenhang wurden von ihm Zuckerfasern als potentiell besseres Porogen angesehen, darüber hinaus verweist er auf eine Veröffentlichung von ZHANG *et al.*^[264] Hier werden anspruchsvolle Strukturen durch Porogene in polymeren Materialien erzeugt und u. a. systematisch angeordnete Zuckerfasern für die Herstellung dreidimensionaler netzwerkartiger *scaffolds* verwendet.

In diesem Abschnitt konnte die generelle Anwendbarkeit des Porogenverfahrens in Kombination mit dem Begasungsverfahren an dem lösemittelfrei produzierten 80:20-Kompositmaterial gezeigt werden. Obwohl hierbei die Vermengung des Porogens mit dem Komposit mechanisch erfolgte, konnten isotrope, poröse Strukturen erhalten werden. Welche Porengröße letztendlich für die Besiedlung mit Knochenzellen am besten geeignet ist, müsste durch weitere biologische Untersuchungen abgeklärt werden. Ein Nachteil des Porogenverfahrens ist die reduzierte Stabilität der Formkörper. Je poröser ein Formkörper ist, desto instabiler und damit weniger belastbar ist die Struktur. Für osteogen wirksame Implantate ist das Porogenverfahren weniger gut geeignet, da hierdurch das Auswaschen der

Porogene Wachstumsfaktoren herausgelöst werden könnten. Für die Herstellung poröser Systeme im Generellen ist es hingegen eine elegante Methode. Nur die Kanalbildung innerhalb des *scaffolds* gestaltet sich als schwierig. In der industriellen Fertigung ist es nicht praktikabel und zu aufwändig, einzelne Fasern im Material gleichmäßig zu verteilen, um nach deren Extraktion Poren miteinander im Sinne einer Interkonnektion zu verbinden. Insbesondere beim Schäumungsprozess kommt es zu einer Art Fluidisierung des Polymers, bei dem ein gleichmäßiges, porogenes Fasernetzwerk in ein unregelmäßiges und zufällig verteiltes System übergehen kann. Durch etwaige Konvektionsbewegungen können die Fasern nur unvorhersehbar in die Polymermatrix inkorporiert werden. Bei den vorliegenden Versuchen wurde deshalb bewusst kein gleichmäßig angeordnetes Gitter aus Fasern erzeugt, sondern generell geprüft, inwieweit Kanäle überhaupt in diesem Kompositmaterial entstehen können.

5.6.4. Porosität durch einen mechanischen Bohrprozess

Eine ganz konventionelle Methode zur Erzeugung von Porosität ist der mechanische Bohrprozess, der neben der Generierung von Poren auch Auskunft über die Materialstabilität liefert. Abbildung 64 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von zwei aufgeschäumten Formkörpern des 80:20-Komposits nach dem Bohrprozess bei a) 34-facher Vergrößerung und b) bei 35-facher Vergrößerung und mit 15 Massenprozent Gentamycinsulfatbeladung. Unten rechts in der Ecke von Abbildung 64a und 64b sind jeweils Ausschnitte aus den makroskopischen Aufnahmen der Formkörper eingeblendet. Mit einem feinen Bohrer wurden hier mehrere Löcher in den rechteckigen Formkörper gebohrt. Die Hohlform zum Begasen entspricht wieder den Formen zur Erzeugung der Biegebruchstäbe für die Dreipunktbiegung. Die Beladung mit 15 % Gentamycinsulfat simuliert hier die Einbringung eines biologischen Wirkstoffs (vgl. Kap. 5.8). Es konnte gezeigt werden, dass das Kompositmaterial auch nach der Beladung mit dem Antibiotikum Gentamycin mechanisch bearbeitet werden konnte. In beiden Fällen konnten sauber gebohrte Kanäle im geschäumten Formkörper hergestellt werden. Diese Löcher sind natürlich im Sinne eines *scaffolds*, der das Einwachsen von Zellen ermöglichen soll, viel zu groß.

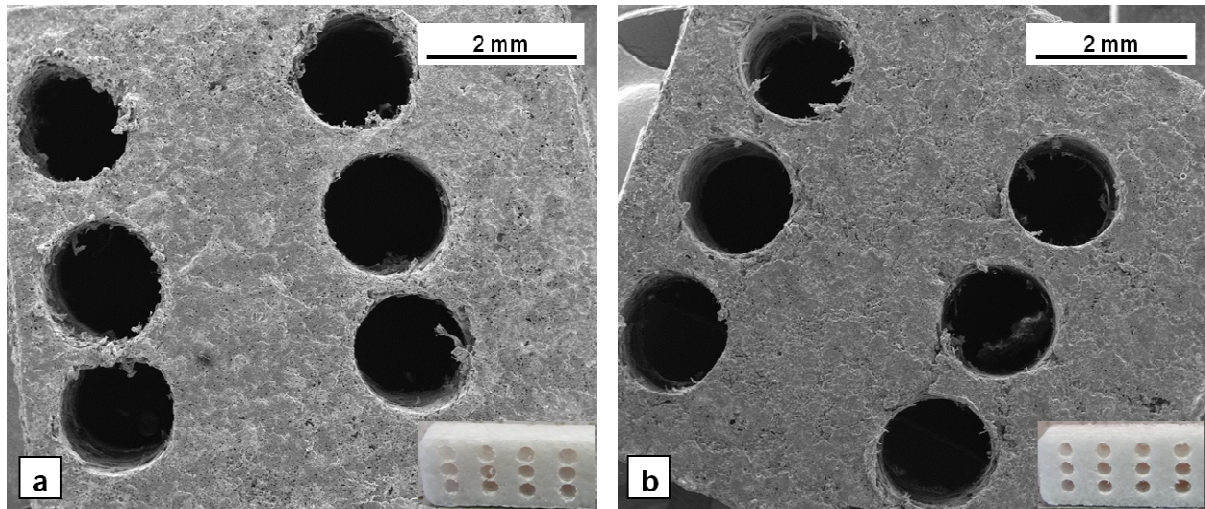


Abbildung 64: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des geschäumten 80:20-Komposits nach dem Bohrprozess: a) ohne Gentamycinsulfat und b) mit 15 Massenprozent Gentamycinsulfat. Unten rechts befindet sich jeweils ein Ausschnitt aus der makroskopischen Aufnahme der Formkörper.

Aber dennoch kann hier eine Porosität generiert werden, die unterstützend zu einer feineren Porosität im Material wirken kann. Darüber hinaus kommt es zu einer Gewichtsreduktion des Formkörpers und einer deutlich vergrößerten Oberfläche, die wiederum den Zugang von Zellen des biologischen Systems erleichtert. TADIC konnte beispielsweise in kaltisostatisch gepressten Calciumphosphatformkörpern eine Porosität durch Bohren herstellen, die zu Kanälen innerhalb des Materials führte.^[261] So kann durch den Schäumungsprozess ein gewisser Porositätsgrad im Material generiert werden, der durch den Bohrprozess auf einer höheren Stufe vollendet wird. Aber auch hier ist es wichtig, die Stabilität der Formkörper nicht durch zuviel Porosität zu gefährden.

5.7. Freies Aufschäumen in offenen PTFE-Formen

5.7.1. Konzept des freien Aufschäumens

In diesem Abschnitt wird die Schäumung der Kompositmaterialien in teilweise offenen Formen vorgestellt. Das fehlgeschlagene Experiment (vgl. Kap. 5.5.1) lieferte bereits wichtige Erkenntnisse zur Porosität von Kompositmaterialien, die einer freien Expansion des Schaumes unterworfen waren. Grundsätzlich kann es bei der Verwendung von geschlossenen Hohlformen zu einem Nachschäumen des Materials bei einem zu frühen Öffnen der Form nach dem Begasen kommen. Neben der Wahl

des Hohlformmaterials, welches aufgrund der unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten für Kohlenstoffdioxid zu einem schnelleren Druckausgleich in der Hohlform führt, wurde in diesem Abschnitt das Schäumungsverhalten der Komposite in speziellen, offenen PTFE-Formen untersucht. Diese Formen sind in Gestalt eines Zylinders konstruiert und bestehen aus zwei zusammensteckbaren PTFE-Elementen. Die nach oben offenen Zylinder ermöglichen während der Dekompressionsphase des Schäumungsprozesses eine freie Expansion des sich bildenden Schaumes in z-Richtung. Abbildung 65 zeigt die technische Konstruktion der aus PTFE gefertigten Hohlzylinder.

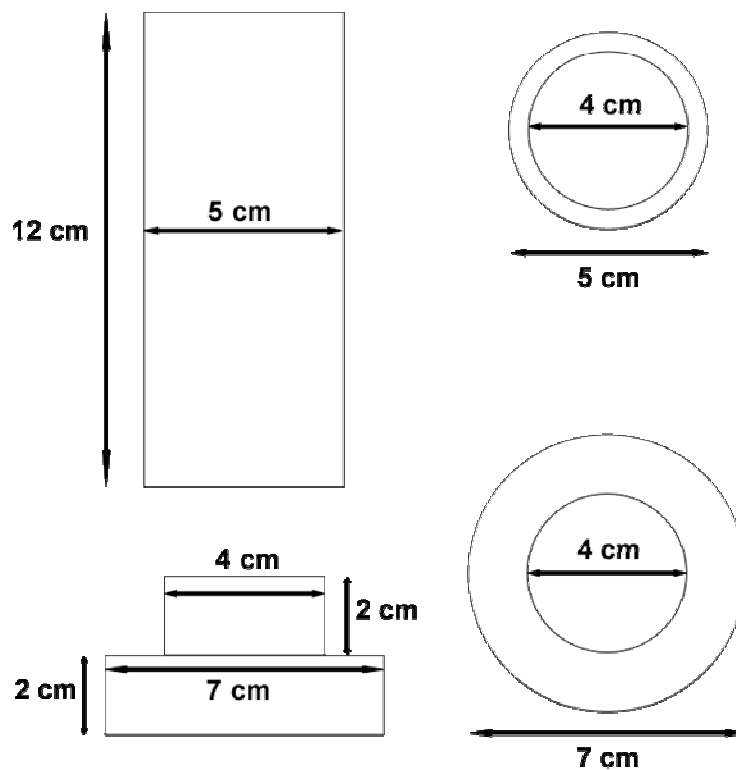


Abbildung 65: Technische Konstruktion der PTFE-Hohlzylinder, die den aufzuschäumenden Kompositen eine freie Expansion in z-Richtung während der Dekompressionsphase der Begasung ermöglichen.

Von besonderem Interesse war die resultierende Porosität der sich bildenden Formkörper in diesen Untersuchungen. Es wurde der Einfluss der Calcitgehalte der Kompositmaterialien auf die Porosität beim freien Aufschäumen ermittelt und anschließend mit dem Schäumungsverhalten von reinem PDLLA verglichen. Zudem

wurde auch ein etwaiger Unterschied zwischen dem UniDuE-Komposit und den mechanisch compoundingierten Kompositen untersucht. Die befüllten Formen werden im Autoklaven bei 37 °C mit 100 bar CO₂-Druck für zwei Stunden begast. Diese Prozessparameter entsprechen den bisher verwendeten Bedingungen. Anschließend wird innerhalb von 20 Minuten mit einer Dekompressionsrate von 5 bar min⁻¹ auf Umgebungsdruck entspannt. Im Kapitel 5.7.3 wird der Einfluss unterschiedlicher Dekompressionsraten während des Begasungsprozesses auf die Porosität der resultierenden Formkörper analysiert.

5.7.2. Freies Aufschäumen der Kompositmaterialien

Tabelle 11 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen.

Tabelle 11: Schäumungsverhalten der aufzuschäumenden Materialien beim Begasen in offenen PTFE-Hohlzylindern. Analysiert wurden reines PDLLA, das 85:15-Komposit, das 80:20-Komposit, das 75:25-Komposit und das UniDuE-Kompositmaterial.

PDLLA / Komposit	Ansatz je 5 g	Volumen	Rohdichte	Reindichte	Porosität
		V in cm ³	ρ_{Roh} in g cm ⁻³	ρ_{Rein} in g cm ⁻³	Φ in %
PDLLA	Granulat	32,00	0,16	1,22	87
	Flocken	19,00	0,26		78
85:15	1	10,50	0,48	1,33	64
	2	11,00	0,45		66
80:20	1	10,00*	0,50	1,37	64
	2	9,50	0,53		62
75:25	1	9,00	0,56	1,41	61
	2	8,50	0,59		58
UniDuE	1	8,50	0,59	1,37	57

Volumina berechnet über die Wasserverdrängung der Formkörper

*berechnet über mathematisch geschätztes Volumen des Formkörpers

mit Porosität Φ aus $(1 - \rho_{\text{Roh}}/\rho_{\text{Rein}}) \cdot 100$ und der Rohdichte ρ_{Roh} aus $m_{\text{Körper}}/V_{\text{Körper}}$

Bis auf das UniDuE-Komposit wurden jeweils zwei Ansätze der einzelnen Komposite bzw. des PDLLAs analysiert. Bei den durchgeführten Schäumungsversuchen konnte gezeigt werden, dass reines PDLLA ohne Füllstoff bei der freien Schäumung in z-Richtung zu porösen Formkörpern mit einer Porosität zwischen 80 % und 90 % aufschäumt. Diese Porositätsgrade entsprechen den maximal erreichbaren Porositäten von reinen polymeren Formkörpern und wurden bereits in der Literatur beschrieben. Beispielsweise wurde von MOONEY *et al.* ein Verfahren zur Herstellung von porösen Schwämmen aus PLGA beschrieben.^[265] Hier konnten durch die Begasung mit Kohlenstoffdioxid Porositäten von bis zu 93 % generiert werden.

Vergleicht man nun die unterschiedlichen Kompositmaterialien miteinander, so zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Porositätsgrade, alle liegen zwischen 58 % und 66 %. Dennoch kann hier ein gewisser Trend erkannt werden, denn mit steigendem Calcitgehalt der Kompositmaterialien reduziert sich der Porositätsgrad im geschäumten Material. Der steigende Füllstoffgehalt beeinflusst den Schäumungsprozess zunehmend. Dieses Verhalten konnte beispielsweise von SCHILLER untersucht werden, der den Einfluss des Füllstoffgehalts auf das Schäumungsverhalten analysierte.^[57] Der Herstellungsprozess der einzelnen Kompositmaterialien und der Unterschied der Morphologie der Calcitkristalle zeigen keinen Einfluss auf das Schäumungsverhalten. Die Porositätsgrade des UniDuE-Komposits liegen mit etwa 60 % auf dem Level der mechanisch compoundierten Kompositmaterialien. Die Formkontrolle der geschäumten Formkörper kann beim freien Schäumen natürlich nicht realisiert werden, einzig der Durchmesser und die zylindrische Form wirken als Leitschiene des expandierenden Schaumes. Die Abbildungen 66 und 67 zeigen makroskopische Aufnahmen der entstandenen Formkörper. Das UniDuE-Komposit und die mechanisch compoundierten Formkörper sehen recht ähnlich aus und zeigen auf ihrer Oberfläche ein relativ körniges Oberflächenrelief. Beim reinen PDLLA erkennt man die erstarrten Blasen, die während der Dekompression des Kohlenstoffdioxids im Formkörper entstanden sind. Das stärkere Schäumungsverhalten wird auch an den Abmessungen der Formkörper sichtbar, die entlang der z-Achse wesentlich höher geschäumt sind. Das PDLLA-Granulat schäumt dabei noch intensiver als das PDLLA in Flockenform. Das PDLLA-Granulat wurde von der Firma Karl Leibinger Medizintechnik GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt.



Abbildung 66: Makroskopische Aufnahmen der frei aufgeschäumten Komposite: a) 85:15-Komposit, b) 80:20-Komposit und c) 75:25-Komposit.

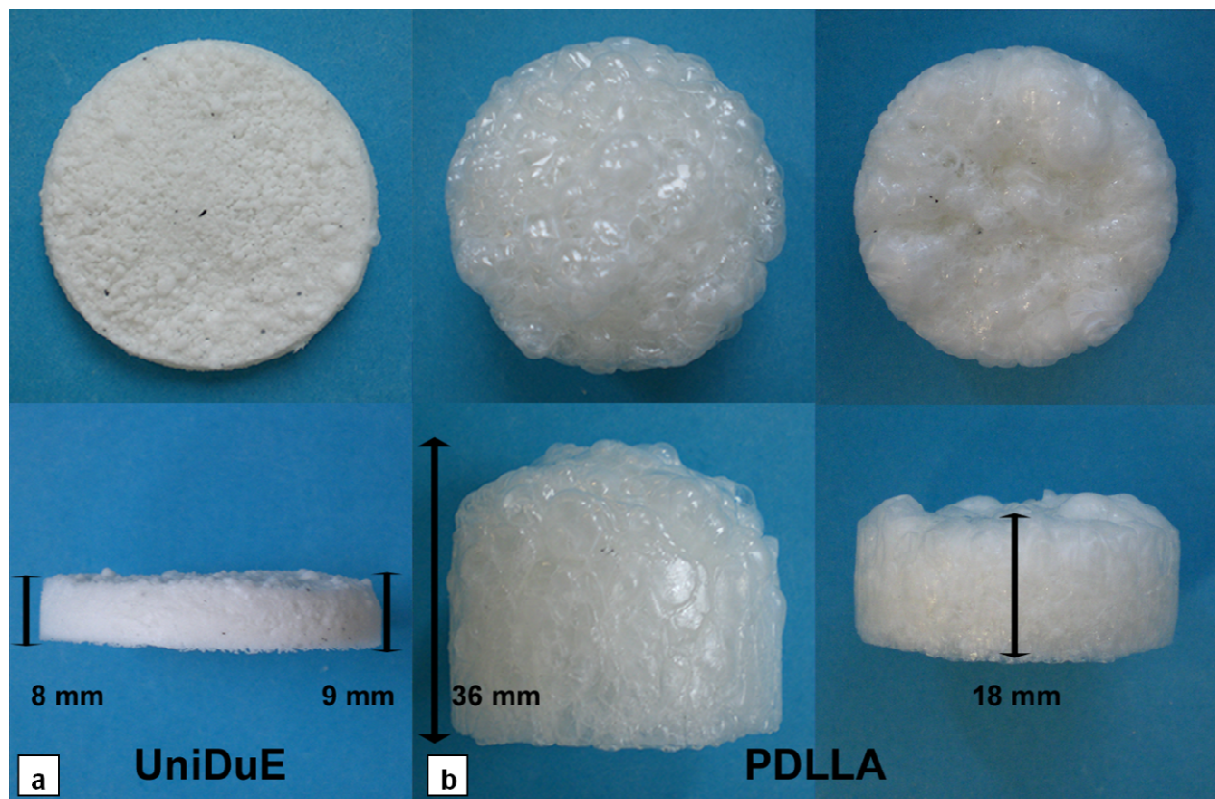


Abbildung 67: Makroskopische Aufnahmen der frei aufgeschäumten Komposite: a) UniDuE-Komposit und b) PDLLA-Schaum aus Granulat und aus Flocken.

5.7.3. Freies Schäumen mit variabler Dekompressionsrate

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss der Dekompressionsrate auf die Porosität beim freien Aufschäumen untersucht. Beim Begasungsverfahren ist die Dekompression der entscheidende Schritt bei der Generierung der Schaumstruktur. Während der Dekompression des Gases kommt es zur Blasenbildung innerhalb des Materials, dementsprechend sollte die Dekompressionsgeschwindigkeit einen Einfluss auf die resultierende Porosität in den Formkörpern haben. Zum Vergleich wurden daher das UniDuE-Komposit, das 85:15-Komposit und reine PDLLA-Flocken erneut frei aufgeschäumt und anschließend mit einer Dekompressionsrate von 10 bar min^{-1} auf Umgebungsdruck entspannt. Diese Ergebnisse wurden dann mit den vorherigen Daten der mit einer Dekompressionsrate von 5 bar min^{-1} entspannten Proben verglichen und sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Einfluss unterschiedlicher Dekompressionsraten auf die Porosität der resultierenden Formkörper. Analysiert wurden das 85:15-Komposit, das UniDuE-Komposit und reines PDLLA in Flockenform.

Komposit bzw. PDLLA	Formkörper					Reindichte des Komposits ρ_{Rein} in g cm^{-3}
	Dekompression	Masse	Volumen	Rohdichte	Porosität	
	in bar min^{-1}	m in g	V in cm^3	ρ_{Roh} in g cm^{-3}	Φ in %	
85:15	5	5	10,50	0,48	64	1,33
	10	5	13,00	0,38	71	
UniDuE	5	5	8,50	0,59	57	1,37
	10	5	10,50	0,48	65	
PDLLA	5	5	19,00	0,26	78	1,22
	10	5	44,00	0,11	91	

mit Porosität Φ aus $(1 - \rho_{\text{Roh}}/\rho_{\text{Rein}}) \cdot 100$ und der Rohdichte ρ_{Roh} aus $m_{\text{Körper}}/V_{\text{Körper}}$

Durch die Versuche konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Dekompressionsrate von 5 auf 10 bar min^{-1} zu einer Erhöhung des Porositätsgrades innerhalb der Formkörper führt. Die Porosität ist im Durchschnitt um 10 % gesteigert. Aufgrund der gesteigerten Dekompressionsrate kommt es vermutlich zu einer

stärkeren Blasenbildung während der Dekompression, die mit einer energischeren Expansion des Schaumes einhergeht. Das gezeigte Verhalten gilt für zylindrische Hohlformen, bei denen nur eine Vorzugsrichtung für die freie Expansion des Materials zur Verfügung steht. Es stellt sich natürlich die Frage, welchen Einfluss das freie Schäumen unter diesen Bedingungen auf die Schaumstruktur des Materials hat. Um das zu untersuchen, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die Formkörper wurden zunächst mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in der Mitte durchgebrochen. Abbildung 68 zeigt zwei repräsentative Bruchflächen des frei geschäumten UniDuE-Komposits. Abbildung 68a zeigt die resultierende Schaumstruktur bei einer Dekompressionsrate von 5 bar min^{-1} und Abbildung 68b bei einer Dekompressionsrate von 10 bar min^{-1} .

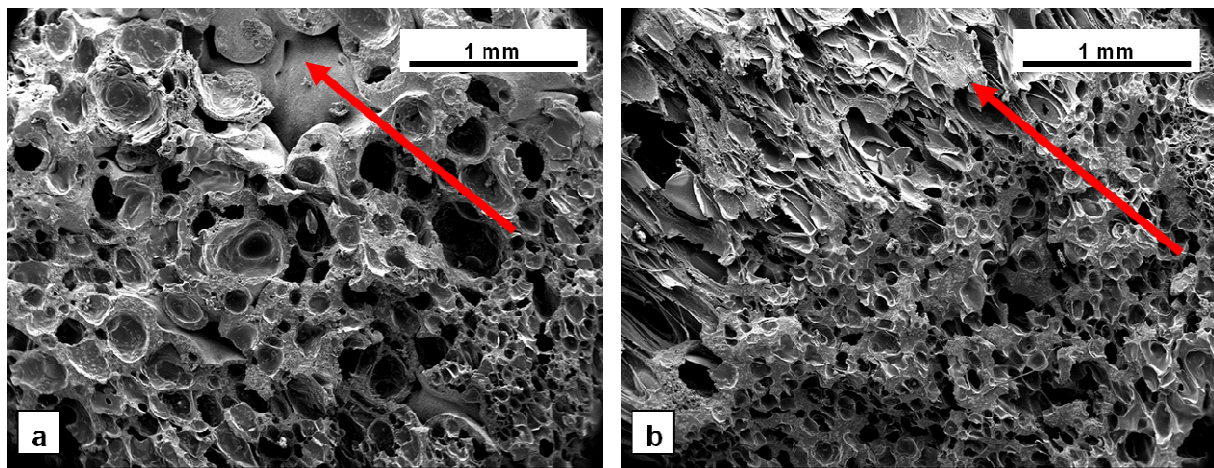


Abbildung 68: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Bruchflächen des frei geschäumten UniDuE-Komposits: a) Schaumstruktur bei einer Dekompressionsrate von 5 bar min^{-1} und b) Schaumstruktur bei einer Dekompressionsrate von 10 bar min^{-1} . Die roten Pfeile zeigen die Expansionsrichtung des Schaumes entlang der z-Achse.

Bei der Betrachtung der Schaumstruktur zeigt sich in beiden Fällen ein inhomogener Schäumungsverlauf entlang der Expansionsachse. Die Porengröße wächst mit der Zunahme der Expansionsstrecke des Schaumes. Dies lässt sich damit erklären, dass die Schäumung gegen eine Art Widerstand anwirken muss. Dieser Widerstand wird von dem geschichteten Kompositmaterial hervorgerufen. Die Schäumung im oberen Bereich arbeitet demnach gegen einen geringeren Widerstand an, und das wiederum bewirkt die Bildung größerer Poren im oberen Bereich. Im unteren Bereich wird die

Schäumung hingegen durch die Masse des darüberliegenden Kompositmaterials abgedämpft. Diese Versuche dienen als erste Studien, um das Konzept des freien Schäumens besser zu verstehen und in Zukunft im biomedizinischen Kontext anwendbar zu machen.

5.8. Kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs Gentamycin

Das Gebiet der Biomaterialentwicklung ist eng verknüpft mit der Thematik der kontrollierten Wirkstofffreisetzung. Neben der Freisetzung von osteogen wirkenden Substanzen spielt die Infektionsprophylaxe eine große Rolle, insbesondere um schwerwiegende postoperative Komplikationen von vornherein zu verhindern. Ein ausführlicher Übersichtsartikel über die kontrollierte Wirkstofffreisetzung aus dreidimensionalen *scaffolds* findet sich beispielsweise bei MOURIÑO *et al.*^[22] Neben der systemischen Gabe von Antibiotika gibt es die Möglichkeit, entsprechende Wirkstoffe lokal zu applizieren, indem sie in das Implantat inkorporiert werden und nach der Implantation im Verlauf der Zeit freigesetzt werden. So kann einer Entzündung des umliegenden Gewebes gezielt lokal vorgebeugt werden. Ein besonderes Risiko stellt die chronische Verlaufsform der Osteomyelitis dar.^[186] Aus technischer Sicht müssen auch potentielle Implantatmaterialien optimiert bzw. auf ihr Freisetzungsverhalten von Wirkstoffen zur kontrollierten Abgabe hin untersucht werden.

5.8.1. Freisetzungskinetik von Gentamycin

In diesem Kapitel wird die kontrollierte Freisetzung des Antibiotikums Gentamycin aus dem geschäumten 80:20-Kompositmaterial analysiert. In vorherigen Untersuchungen konnte bereits das Freisetzungsverhalten von Gentamycin aus dem geschäumten UniDuE-Komposit studiert werden.^[71, 72] An dieser Stelle stellt sich die Frage, inwieweit der unterschiedliche Produktionsprozess der Kompositmaterialien und die Morphologie der enthaltenden Calcitkristalle das Freisetzungsverhalten von Gentamycin beeinflusst und ob die Ergebnisse vergleichbar sind. Daher wurden rechteckige Formkörper mit den Abmessungen von 90 mm · 8 mm · 4 mm durch den Begasungsprozess mit den bekannten Prozessparametern hergestellt, wobei diese mit einem Massenanteil von 15 % Gentamycinsulfat bezogen auf das Kompositmaterial beladen wurden. Im Unterschied zu den vorangegangenen Untersuchungen wurde das Gentamycinsulfat hierbei mechanisch mit dem

Kompositmaterial vor der Begasung und Befüllung der Hohlformen vermischt. Bei den Analysen des UniDuE-Komposits wurde das Antibiotikum während der Herstellung der Komposite zusammen mit dem Calcit in Dichlormethan suspendiert.^[71, 72] Diese Faktoren könnten zu einem gänzlich anderen Freisetzungsprofil führen. Um dieses zu ermitteln, wurden Freisetzungsexperimente mit den beladenen Probekörpern durchgeführt. Abbildung 69 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von reinem Gentamycinsulfat bei einer a) 1000-fachen und b) 5000-fachen Vergrößerung.

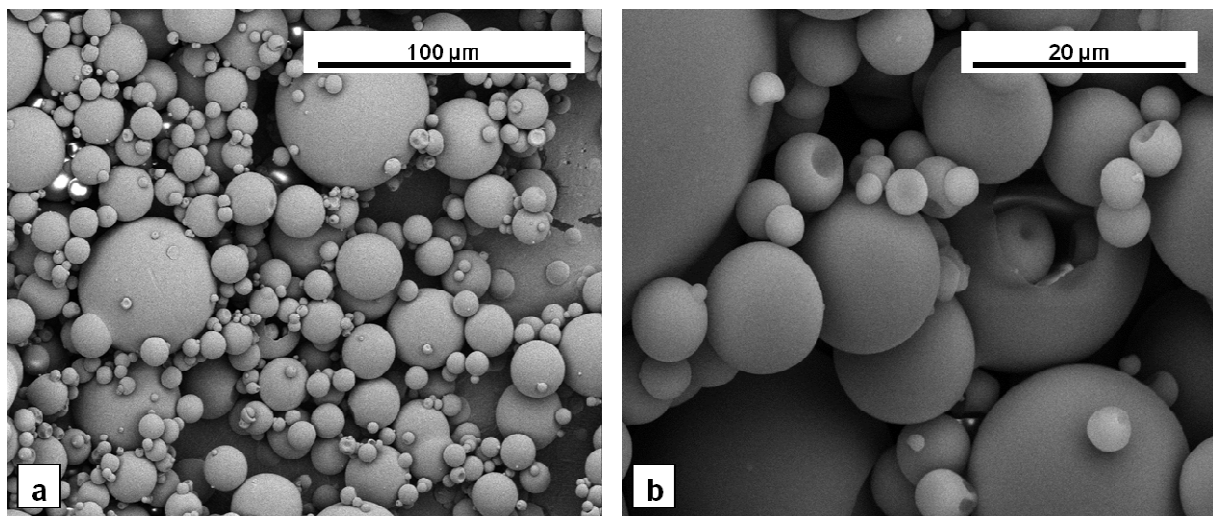


Abbildung 69: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von reinem Gentamycinsulfat.

Um die Freisetzungskinetik zu bestimmen, wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Jeweils ein beladener Formkörper wurde in 250 mL PBS-Lösung bei 37 °C inkubiert und die freigesetzte Menge Gentamycin über einen Zeitraum von 86 Tagen gemessen. Freigesetztes Gentamycin kann hierbei nicht direkt gemessen werden, sondern muss zuvor derivatisiert werden. Hierzu wird auf ein Verfahren von SAMPATH *et al.* zurückgegriffen, bei dem Gentamycin durch *ortho*-Phtaldialdehyd zu einem Gentamycin-*ortho*-Phtaldialdehyd-Komplex umgesetzt wird.^[208] Anschließend kann die Konzentration von Gentamycin mittels UV-Vis-Spektroskopie quantitativ ermittelt werden. Zuvor wird jedoch eine Kalibration des Systems durchgeführt, indem bekannte Gentamycinkonzentrationen vermessen werden. Zu jedem Messzeitpunkt wurde eine Menge von 0,1 mL des Inkubationsmediums entnommen und gemäß der Vorschrift untersucht.^[208] Nur zur ersten Messung wurden 0,5 mL

entnommen, da hier die Intensität des Messsignals im UV-Vis-Spektrum noch unbekannt war. Die entnommene Menge an Flüssigkeit wurde bei der Berechnung jeweils berücksichtigt. Die Ergebnisse der Freisetzung sind in Abbildung 70 dokumentiert.

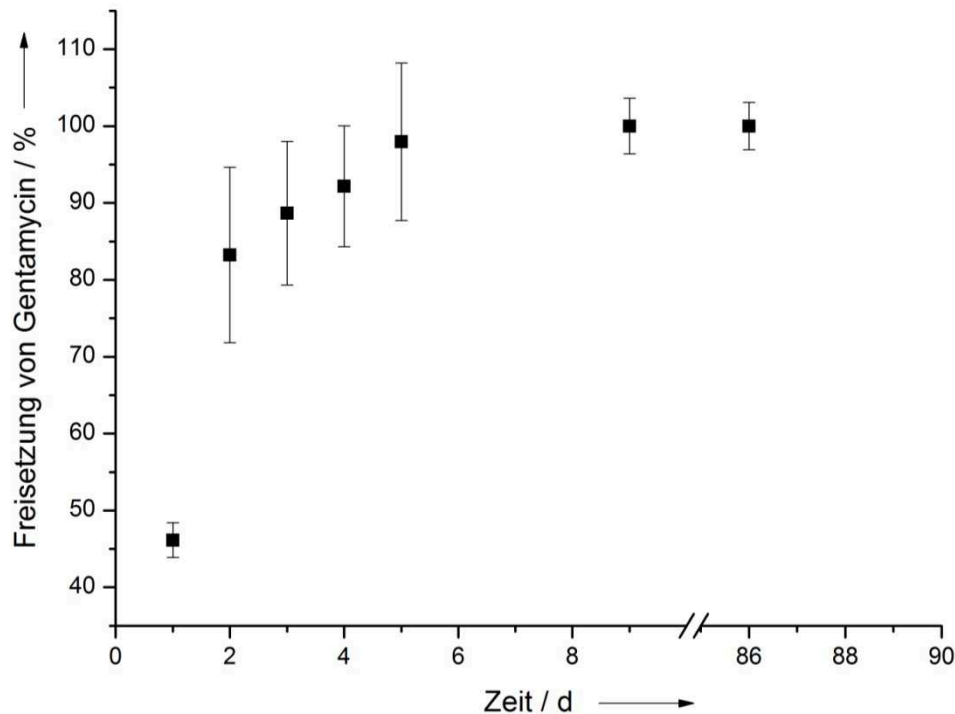


Abbildung 70: Freisetzung von Gentamycin aus dem Kompositmaterial in Prozent des Gesamtgehaltes und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Besonders auffällig ist die starke, initiale Freisetzung des Gentamycins zu Beginn des Experiments. Nach zwei Tagen sind bereits über 80 % des Antibiotikums freigesetzt worden, nach fünf Tagen flacht die Kurve langsam ab. Das Experiment zeigt, dass die gesamte Menge des Gentamycins bereits nach kurzer Zeit freigesetzt wurde. Vergleicht man diese Kinetik mit vorangegangenen Untersuchungen^[71, 72] zur Freisetzung von Gentamycin aus dem UniDuE-Komposit, so sind einige Unterschiede zu erkennen. Die Charakteristik der Freisetzung ist zwar ähnlich, jedoch auf einer anderen Zeitskala. So wurden beim UniDuE-Komposit 50 % der enthaltenen Menge in den ersten zehn Tagen freigesetzt, nach ca. 40 Tagen waren immerhin noch über 20 % des Gentamycins im Formkörper enthalten. Sowohl beim 80:20-Komposit als auch bei UniDuE-Komposit lässt sich die starke Freisetzung am Anfang der Inkubation durch die Freisetzung der nah an der Oberfläche befindlichen

Gentamycinmenge erklären. Dies wirft die Frage auf, warum die Freisetzung des Gentamycins beim 80:20-Komposit wesentlich schneller und weniger kontrolliert verläuft als beim UniDuE-Komposit. Eine Erklärung liefert die unterschiedliche Beladung des Komposits mit dem Gentamycinsulfat. Während das Gentamycin beim UniDuE-Komposit durch den lösemittelbasierten Herstellungsprozess richtig in die Polymermatrix inkorporiert wird, befindet es sich bei der lockeren, mechanischen Vermengung mit dem 80:20-Komposit nur in den Zwischenräumen der Kompositkörner. Während des Schäumungsprozesses sollte sich das Gentamycin mit dem fluidisierten Polymer vermischen, dies passiert aber nur zu einem geringen Teil. Durch die Diffusion von Wasser in die Formkörper kann das Antibiotikum somit wesentlich schneller ausgewaschen werden als beim UniDuE-Komposit. Somit scheint der lösemittelbasierte Herstellungsprozess der Komposite für eine etwaige Inkorporation von Wirkstoffen wie Gentamycin besser geeignet als das mechanische Vermengen mit dem Komposit. Hier könnten aber eventuell weitere Methoden untersucht werden, indem versucht wird, das Antibiotikum bereits während der Kompositherstellung in das Material zu integrieren.

5.8.2. Schäumungsverhalten des Kompositmaterials mit Gentamycin

Durch die Beladung des Komposits mit Gentamycin entstehen auch Unterschiede in der Schaumstruktur des geschäumten Materials, wie in Abbildung 71 zu erkennen ist.

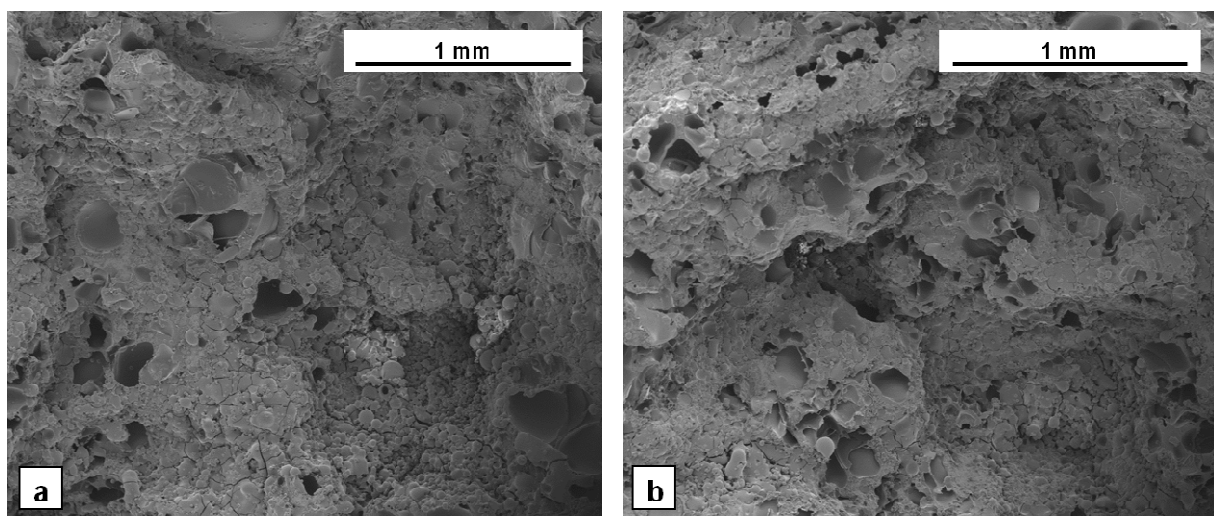


Abbildung 71: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des mit 15 Massenprozent Gentamycin beladenen 80:20-Komposits.

Abbildung 71 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des mit 15 Massenprozent Gentamycin beladenen 80:20-Komposits bei einer a) 100-fachen und b) 109-fachen Vergrößerung. Die Schaumstruktur wirkt deutlich dichter als ohne Gentamycinbeladung, auch die Anzahl der Poren scheint zum einen geringer zu sein, zum anderen weisen die Poren einen kleineren Durchmesser auf. Da Gentamycin nicht nur als Wirkstoff, sondern auch als Füllstoff im Komposit wirkt, beeinflusst es den Schäumungsprozess.

5.8.3. Mechanische Kenngrößen des mit Gentamycin beladenen Komposits

In diesem Kapitel werden die mechanischen Kenngrößen des mit Gentamycin beladenen 80:20-Komposits vorgestellt. Da die Beladung des UniDuE-Komposits und die des 80:20-Komposits mit Gentamycin unterschiedlich ist, stellt sich die Frage, in welchem Maß sich die mechanischen Kenngrößen der geschäumten Materialien unterscheiden. Dazu wurden Dreipunktbiegeversuche mit den beladenen Formkörpern durchgeführt und mit vorherigen mechanischen Messungen des UniDuE-Komposits verglichen.^[72] Es wurden der *E*-Modul und die Biegefestigkeit des Materials bestimmt. Abbildung 72 zeigt die Messergebnisse der *E*-Moduln von fünf mit 15 Massenprozent Gentamycin beladenen Probekörper.

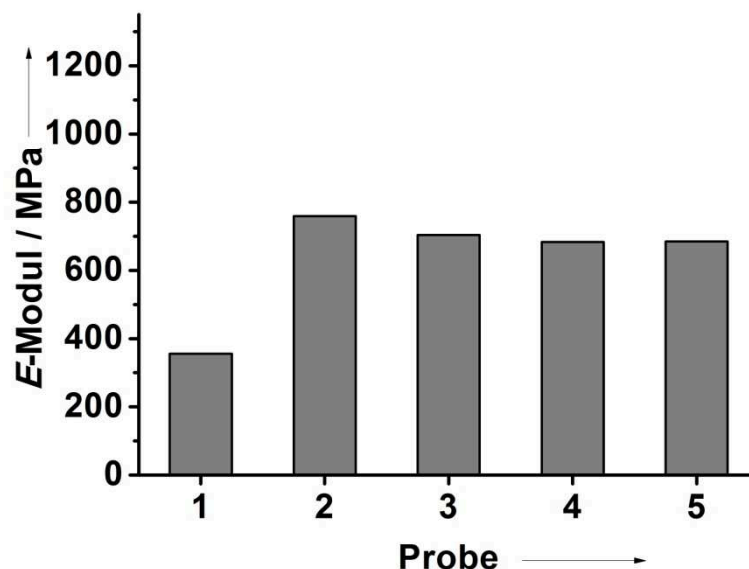


Abbildung 72: Durch Dreipunktbiegung ermittelte *E*-Moduln der fünf mit 15 Massenprozent Gentamycin beladenen Probekörper.

Abbildung 73 zeigt die Messergebnisse der Biegefestigkeit der fünf mit 15 Massenprozent Gentamycin beladenen Probekörper.

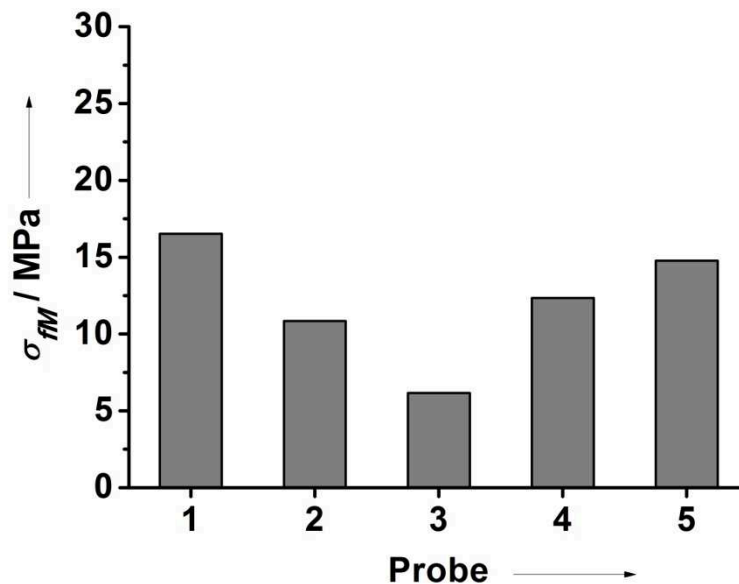


Abbildung 73: Durch Dreipunktbiegung ermittelte Biegefestigkeit der fünf mit 15 Massenprozent Gentamycin beladenen Probekörper.

Betrachtet man die *E*-Moduln der Probekörper und vergleicht sie mit dem unbeladenen 80:20-Kompositmaterial, so zeigen sich verringerte Werte für den *E*-Modul des Materials. Sie liegen ungefähr 100 MPa bis 150 MPa unter den Werten des unbeladenen Komposits, nur der Wert der ersten Probe fällt noch geringer aus. Die Biegefestigkeit weist eine sehr große Streuung der Messwerte auf. Durchschnittlich ist der Wert der Biegefestigkeit niedriger als bei dem unbeladenen 80:20-Komposit. Vergleicht man die Werte mit den mechanischen Kennwerten des mit Gentamycin beladenen UniDuE-Komposits, so zeigt sich ein etwas anderer Trend.^[72] Bei dem UniDuE-Komposit ist der *E*-Modul des geschäumten Materials minimal gegenüber dem unbeladenen UniDuE-Komposit erhöht. Betrachtet man die Biegefestigkeit des mit Gentamycin beladenen UniDuE-Komposits, so ist diese ca. 2 MPa niedriger als die Biegefestigkeit des unbeladenen Komposits. An den Messungen wird deutlich, dass sich die unterschiedliche Art der Gentamycinbeladung auch auf die mechanischen Kenngrößen auswirkt. Je nachdem, wie das Antibiotikum strukturell im Kompositmaterial inkorporiert ist, ändert sich die Festigkeit des Materials entsprechend. Inwieweit das Kompositmaterial

selbst neben der Art der Beladung für die entsprechend veränderten Eigenschaften verantwortlich ist, kann nicht ohne Weiteres beantwortet werden.

5.9. Zusammenfassung – Kompositmaterialien

Das Ziel in diesem Teil der Arbeit bestand in der Untersuchung des Potentials eines biokompatiblen Komposits als Knochenersatzmaterial. Dieses Material bestehend aus Poly-(D,L-Lactid) und Calcit unterscheidet sich durch ein mechanisches Compoundierungsverfahren des Herstellers und der sphärischen Morphologie der Calcit-Partikel deutlich von dem zuvor untersuchten und etablierten Kompositmaterial von SCHILLER, hat dieses aber als Vorbild.^[57] Es wurden Kompositmaterialien, mit der Vorgabe eines lösemittelfreien Herstellungsverfahrens, mit unterschiedlichen Calcitgehalten geliefert und entsprechend untersucht. Ziel dieses Projektes war die Entwicklung osteogen wirksamer, resorbierbarer Implantate zur knöchernen Rekonstruktion im Bereich des Gesichtsschädels. In der vorliegenden Arbeit wurden die Kompositmaterialien auf ihre Eignung als Knochenersatzmaterial hin untersucht und mit dem etablierten Material verglichen. Hierbei standen insbesondere der Einfluss des lösemittelfreien Herstellungsverfahrens sowie die sphärische Morphologie der Calcitpartikel auf die Eigenschaften des Biomaterials im Fokus. Die polymeren Kompositmaterialien wurden durch Begasung in PTFE-Hohlformen mit überkritischem Kohlenstoffdioxid zu porösen Formkörpern aufgeschäumt und fungierten als Implantatmodell.

Zu Beginn wurden die Kompositmaterialien ausführlich charakterisiert und mittels Rasterelektronenmikroskopie, Röntgenpulverdiffraktometrie, Thermogravimetrie und IR-Spektroskopie untersucht. Die Morphologie der Calcitkristalle wurde analysiert und die genaue Zusammensetzung des Materials studiert. Daraufhin wurden die Kompositmaterialien durch den Begasungsprozess zu Formkörpern aufgeschäumt und ihre Schaumstruktur untersucht. Hierbei konnte der Einfluss des Füllstoffgehalts auf das Aufschäumungsverhalten der Materialien, wie es auch schon von SCHILLER beschrieben worden ist,^[57] erfasst werden. Je höher der Gehalt an Calcit im Kompositmaterial war, desto schlechter war die Qualität der resultierenden Schäume. Mittels Rasterelektronenmikroskopie konnte die Struktur der erhaltenen Schäume analysiert werden. Es konnte eine isotrope Verteilung der Porosität im gesamten Formkörper festgestellt werden. Das 80:20-Komposit zeigte beispielsweise eine homogene Verteilung der Poren im Material mit einer Porengröße zwischen 200

und 400 µm und sollte damit ein Einwachsen von Knochenzellen ermöglichen. Besonders wichtig für die Eignung als Biomaterial ist die Kenntnis des Degradationsverhaltens der Kompositmaterialien, hierzu wurden *in vitro*-Versuche bei 37 °C im Reinstwasser und im Sörensen-Puffer durchgeführt und die Massenverluste bzw. die Aufnahme von Inkubationsmedien in die Formkörper untersucht. Die Morphologie der degradierten Kompositmaterialien wurde durch Rasterelektronenmikroskopie dargestellt und die pH-Stabilität der Komposite während der Degradation in Abhängigkeit des Calcitgehaltes analysiert. Etwaige Veränderungen am Polymer während der Degradation konnten durch die Messung der Glasübergangstemperaturen der Komposite festgestellt werden. Insgesamt erwiesen sich die Komposite von ihrem Degradationsverhalten als geeignet für den Einsatz als Knochenersatzmaterial.

Des Weiteren wurden die mechanischen Eigenschaften durch etablierte Prüfverfahren erfasst und in Abhängigkeit der Degradationszeit sowie im trockenen Zustand dargestellt. Hierbei ist eine ausreichende Festigkeit maßgebend für die Verwendung als Knochenersatzmaterial. Als mechanische Kenngrößen wurden die *E*-Moduln und die Biegefestigkeit der Komposite erfasst. Die *E*-Moduln der trockenen Materialien lagen dabei in der Größenordnung des humanen *spongiösen* Knochens. Im Verlauf der Degradation kam es zu einer Abnahme der mechanischen Festigkeit. Dieser Effekt könnte *in vivo* durch ein Einwachsen der Knochenzellen abgepuffert werden.

Als nächstes wurde die Übertragbarkeit in die industrielle Fertigung simuliert, indem großvolumige Formkörper hergestellt wurden. Dabei wurde gezeigt, dass auch großvolumige, zylindrische Formkörper eine homogene Struktur und eine isotrope Verteilung der Porosität über den gesamten Implantatkörper aufweisen können. Auch der Einfluss des Hohlformmaterials auf die Schaumstruktur bzw. Porosität wurde in diesem Kontext untersucht. Durch ein fehlgeschlagenes Experiment konnte eine auffallende Schaumstruktur mit hoher Porosität erhalten werden, die im Näheren analysiert wurde und im Prinzip einem freien Schäumungsvorgang entsprach. Durch die Aufschäumversuche der großvolumigen Zylinder konnte die generelle Übertragbarkeit des Begasungsverfahrens auf größere Probekörper gezeigt werden, was für eine potentielle industrielle Nutzung unabdingbar ist. Ein weiterer Untersuchungsansatz bestand in der Generierung höherer Porositätsgrade im geschäumten Kompositmaterial. Hierzu wurden Formkörper mit einem höheren

theoretischen Porositätsgrad als 50 % hergestellt, indem unter Variation der eingewogenen Menge an Kompositmaterial höhere Porositätsgrade eingestellt wurden. Es wurde allerdings festgestellt, dass die dadurch erzeugten Formkörper nur unzureichend aufgeschäumt werden konnten. Als Alternative wurde die Anwendung des Porogenverfahrens zur Generierung von Porosität innerhalb des geschäumten Materials durch unterschiedliche Porogene in einem weiteren Schritt analysiert. Hierbei wurde der Porositätsgrad theoretisch auf 64 % gesteigert, dadurch konnten isotrope Strukturen im Material erhalten werden. Das Porogenverfahren führt zwar zu höheren Porositätsgraden im Material und damit eher zu interkonnektierenden Systemen, die Anwendung bleibt aber auf Systeme beschränkt, die keinen osteogenen Ansatz verfolgen. Bei der Entfernung des Porogens nach dem Aufschäumen würden sonst etwaige inkorporierte Wachstumsfaktoren aus dem Formkörper ausgewaschen werden.

Die einfachste Methode zur Erzeugung einer höheren Porosität im Material ist das mechanische Bohren des Formkörpers. Die Komposite waren hierbei stabil genug, um sie mechanisch zu bearbeiten. Ein gänzlich anderes Verfahren zur Herstellung poröser Formkörper ist das freie Aufschäumen der Kompositmaterialien. Hierbei wurde untersucht, inwieweit eine freie Expansion des Schaumes während der Dekompression des Begasungsverfahrens entlang der z-Richtung einer offenen zylindrischen Form zu stabilen Formkörpern aufschäumt. Die frei geschäumten Materialien wurden auf ihre Porosität hin untersucht und der Einfluss des Calcitgehaltes auf den Porositätsgrad erfasst. Anschließend wurden diese Experimente mit einer Variation der Dekompressionsrate beim Begasen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Dekompressionsrate zu einer Erhöhung des Porositätsgrades in den Kompositmaterialien führte.

Im letzten Abschnitt dieses Teils der Arbeit wurde die *in vitro*-Freisetzungskinetik des Antibiotikums Gentamycin aus dem aufgeschäumten 80:20-Kompositmaterial erfasst. Mittels UV-Vis-Spektroskopie wurde die Freisetzung im zeitlichen Verlauf untersucht, die Struktur und Porosität wurde durch Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Im letzten Schritt wurden die mechanischen Kenngrößen des mit Gentamycin beladenen Komposits erfasst und mit dem UniDuE-Komposit verglichen. Insgesamt wurde durch die verschiedenen Inkorporationsprozesse des Antibiotikums in die

Komposite ein unterschiedliches Verhalten bei der Freisetzungskinetik und den mechanischen Kenngrößen beobachtet.

Die generelle Eignung der mechanisch compoundierten Komposite als Knochenersatzmaterialien konnte in der Forschung, die in der vorliegenden Arbeit dokumentiert wurde, bestätigt werden. Der Vorteil liegt in dem lösemittelfreien Herstellungsprozess, der für eine spätere Zulassung im biomedizinischen Kontext unabdingbar ist.

6. Ergebnisse und Diskussion – Adsorptionsexperimente

6.1. Konzept

Sobald sich Nanopartikel in biologischen Umgebungen befinden bzw. in das Blut übertreten, kommt es zur Ausbildung einer Proteinkorona an der Grenzfläche jedes einzelnen Partikels.^[131, 137, 138] Generell können Nanopartikel durch diverse Funktionalitäten kovalent modifiziert werden. Ein grundlegendes Problem betrifft die Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und Proteinen. Hierbei ist insbesondere der Einfluss einer Oberflächenmodifizierung auf das Adsorptionsverhalten von Interesse, da die Art und Charakteristik der Partikeloberfläche für die Wechselwirkung entscheidend ist. Die Kenntnis hierüber ist besonders dann unumgänglich, wenn funktionalisierte Nanopartikel zur gezielten Adressierung in biologischen Systemen verwendet werden sollen. Beispielsweise konnte von SALVATI *et al.* gezeigt werden, dass die Adressierungsfähigkeit von mit Transferrin funktionalisierten Nanopartikeln durch die Adsorption einer Proteinkorona auf der Oberfläche verloren geht.^[266] Generell rückt die Betrachtung von Nanopartikeln in biologischen Systemen immer mehr in den Fokus der Wissenschaft.^[100] Eine übersichtliche Darstellung über die Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit Proteinen findet sich bei MAHMOUDI *et al.*^[128]

In diesem Kontext wurden in der vorliegenden Arbeit 18 nm große Siliciumdioxid-Nanopartikel (Ludox® HS-30) durch kovalente Funktionalisierung mit Sulfonsäuregruppen organisch modifiziert (silanisiert), um sie als Modellsystem für die Untersuchung der Wechselwirkung mit Biomolekülen zu verwenden. Zunächst erfolgte eine vollständige Charakterisierung der Siliciumdioxid-Nanopartikel in ihrer reinen sowie in ihrer funktionalisierten Form. Als nächstes wurde die Wechselwirkung der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel mit dem kationischen Molekül Methylenblau (MB), mit Fluoresceinisothiocyanat markiertem bovinem Serumalbumin (FITC-BSA) und mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat markiertem bovinem Serumalbumin (TRITC-BSA) untersucht. Bovines Serumalbumin wurde als Modellprotein verwendet, da Serumalbumin im Blutserum in großer Menge vorkommt und gut charakterisiert ist. Methylenblau wurde als kleines kationisches Vergleichsmolekül verwendet. Von besonderem Interesse war bei den durchgeführten Untersuchungen das Adsorptionsverhalten auf funktionalisierten Oberflächen, in Abhängigkeit vom Adsorptiv-zu-Partikel-Massen-Verhältnis. Abbildung 74 zeigt schematisch die durchgeführte Oberflächenfunktionalisierung und

die anschließenden Adsorptionsexperimente. Alle drei Adsorptive wurden jeweils separat verwendet.

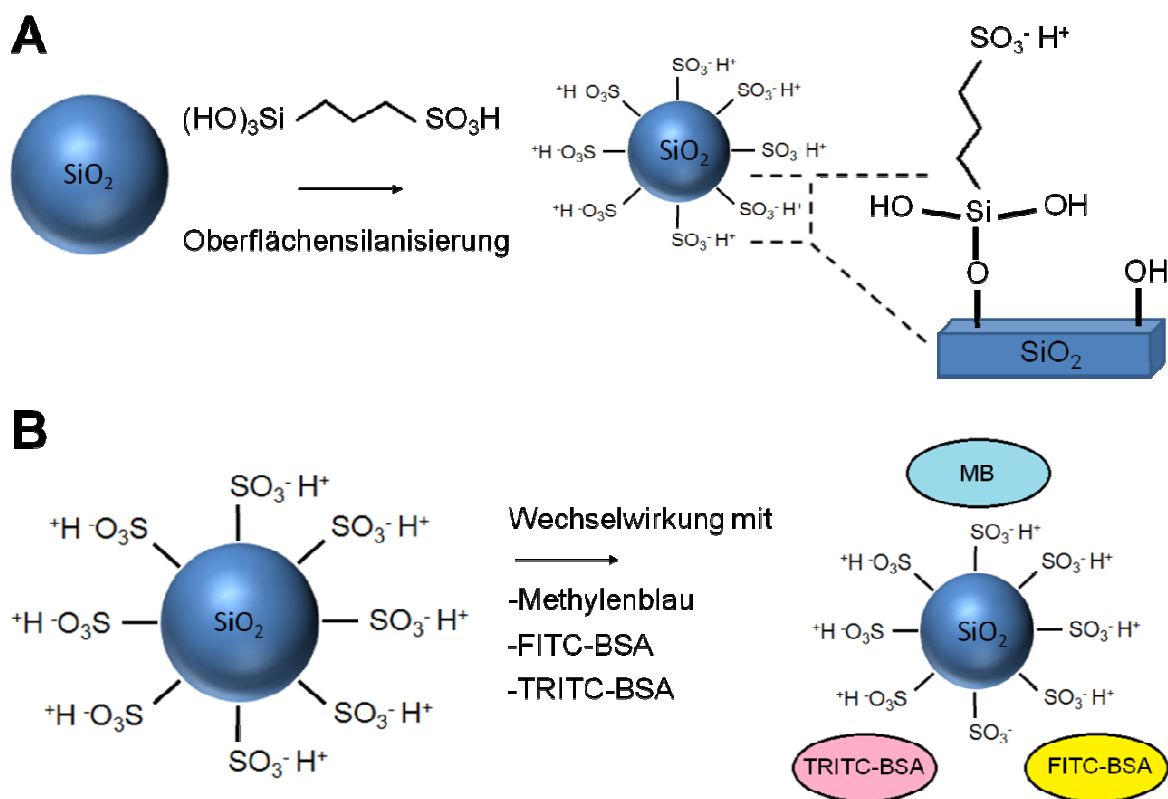


Abbildung 74: Schematische Darstellung der Oberflächenfunktionalisierung von Siliciumdioxid-Nanopartikeln (A) und die anschließende Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den funktionalisierten Nanopartikeln und Methyleneblau, FITC-BSA und TRITC-BSA (B).

Für die Untersuchungen der Wechselwirkung wurden die funktionalisierten Nanopartikel jeweils mit MB, FITC-BSA und TRITC-BSA in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen vermischt und für 24 Stunden stehen gelassen. Nach Einstellung eines Gleichgewichts in den entsprechenden Reaktionsansätzen wurden die Partikel mittels Ultrazentrifugation vom Überstand getrennt. Im Überstand konnte die Konzentration der Adsorptive durch UV-Vis-Spektroskopie bestimmt werden. Da die theoretisch vorhandene Masse bekannt war, konnte ausgerechnet werden, welche Menge an Adsorptiv an den Partikeln adsorbiert wurde.

Abbildung 75 zeigt die Strukturformel des verwendeten kationischen Moleküls Methyleneblau.

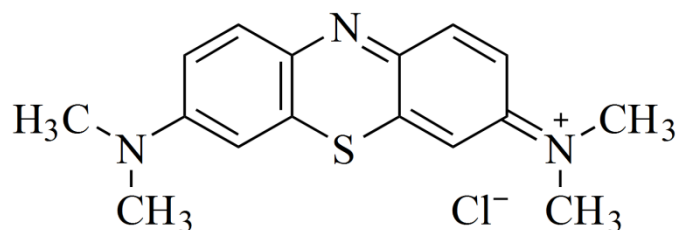


Abbildung 75: Strukturformel von Methyleneblau.

Zur besseren Detektierbarkeit des Proteins BSA mittels UV-Vis-Spektroskopie wurden die mit einem Farbstoff gelabelten Varianten des Proteins für die Experimente verwendet. Abbildung 76a zeigt die Strukturformel von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Abbildung 76b die Strukturformel von Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC).

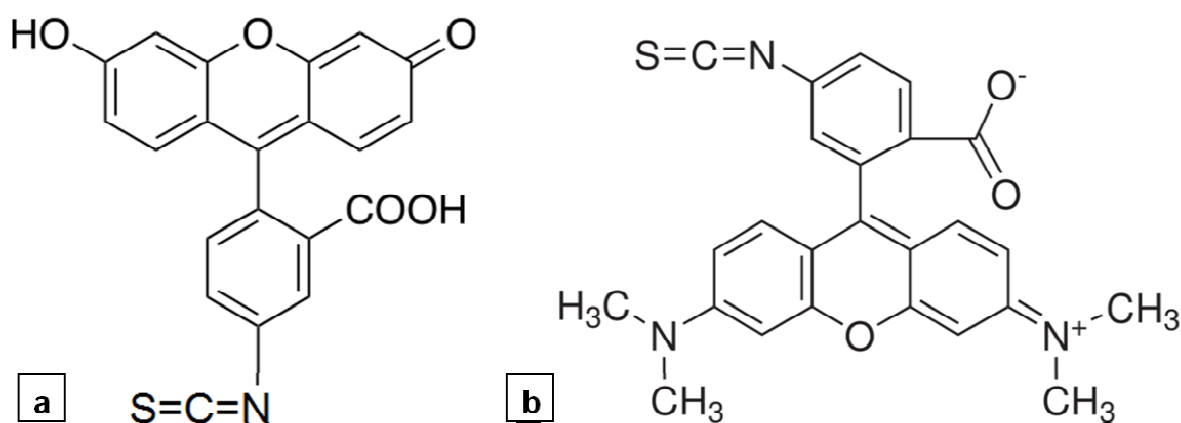


Abbildung 76: a) Strukturformel von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und b) Strukturformel von Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC).

Die Adsorptionsmaxima der drei Adsorptive liegen für Methyleneblau bei ungefähr 660 nm, für Fluoresceinisothiocyanat je nach pH-Wert zwischen ungefähr 485 nm und 495 nm und für Tetramethylrhodaminisothiocyanat bei ungefähr 550 nm. Alle Reaktionsansätze wurden nach dem Vermischen im Dunkeln aufbewahrt, um ein potentiell *photobleaching* der Farbstoffe zu vermeiden.

6.2. Charakterisierung der Siliciumdioxid-Nanopartikel

6.2.1. Größe der Partikel

Bei den Siliciumdioxid-Nanopartikeln (Ludox[®] HS-30) handelt es sich um Partikel mit einer mittleren Teilchengröße von ca. 18 nm.^[146] Die Partikel wurden durch gängige kolloidchemische Methoden charakterisiert. Abbildung 77 zeigt eine Aufnahme der Größenverteilung der Siliciumdioxid-Nanopartikel, die durch analytische Scheibenzentrifugation ermittelt wurde. Es zeigt sich eine leichte Schulter zu höheren Partikelgrößen hin, dies ist auf eine leichte Agglomeration der Partikel zurückzuführen. Das Maximum der Größenverteilung liegt hier etwas unter 18 nm.

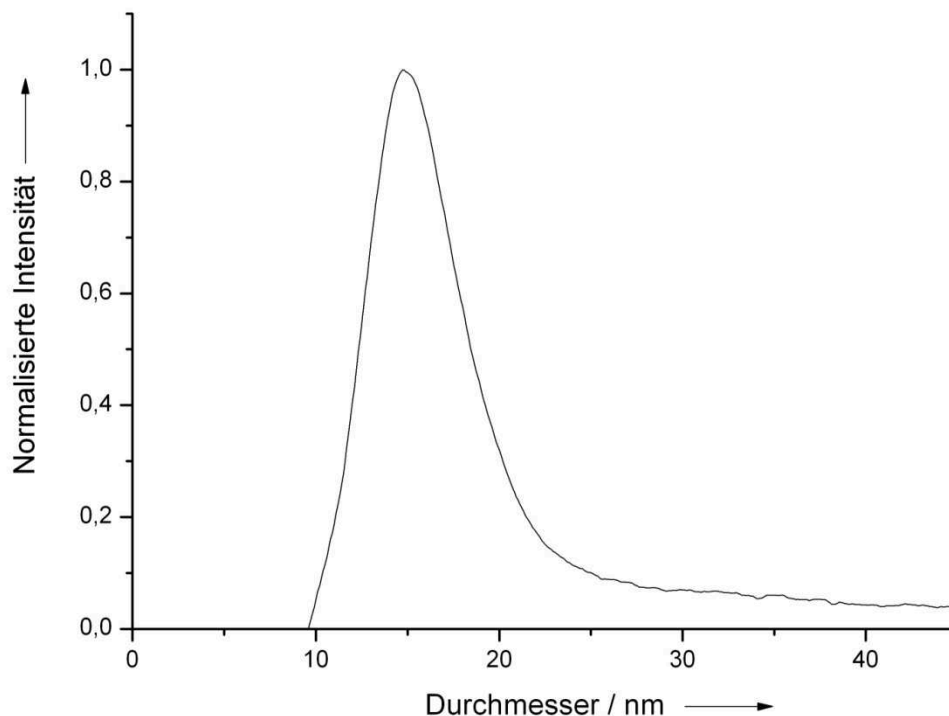


Abbildung 77: Mittels analytischer Scheibenzentrifugation bestimmte Größenverteilung der Siliciumdioxid-Nanopartikel (Ludox[®] HS 30).

Grundsätzlich ist die Messung von Größenverteilungen bei kolloidalen Systemen immer von der verwendeten Messmethode abhängig. Jeder Methode liegt ein physikalisches Messprinzip zugrunde, daher können erhebliche Abweichungen bei den Messungen mit unterschiedlichen Verfahren beobachtet werden. Ein Ergebnis ist immer nur so gut wie auch die Messmethode, so kann eine Größenverteilung immer nur in Abhängigkeit des verwendeten Verfahrens angegeben werden. Vergleicht man beispielsweise die Größenangaben aus der dynamischen Lichtstreuung mit den

Partikelgrößen einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme, so ergeben sich in den meisten Fällen unterschiedliche Größen. Auf einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme kann der Kerndurchmesser direkt abgelesen werden, bei der dynamischen Lichtstreuung hingegen wird der hydrodynamische Durchmesser der Partikel erfasst. Eine systematische Untersuchung der unterschiedlichen Messmethoden am Beispiel einer bimodalen Dispersion aus Silber- und Goldnanopartikeln wurde beispielsweise von MAHL *et al.* beschrieben.^[267] Insgesamt bleibt festzuhalten, dass Angaben zur Größenverteilung am aussagekräftigsten sind, wenn mehrere Methoden zur Charakterisierung herangezogen werden. Dies ist insbesondere für ganz genaue Angaben bei Synthesen wichtig. In der hier zugrunde liegenden Forschung liegt der Schwerpunkt jedoch auf der Adsorptionscharakteristik, sodass eine Abweichung von wenigen Nanometern bei den unterschiedlichen Messmethoden die Adsorptionscharakteristik nicht verändern sollte. Bei den erworbenen Partikeln handelt es sich um amorphe Siliciumdioxid-Nanopartikel, wie im Diffraktogramm in Abbildung 78 zu erkennen ist. Die Anwesenheit von Silanolgruppen auf der Partikeloberfläche zeigt sich in der Elementaranalyse durch einen geringen Anteil von Wasserstoff.

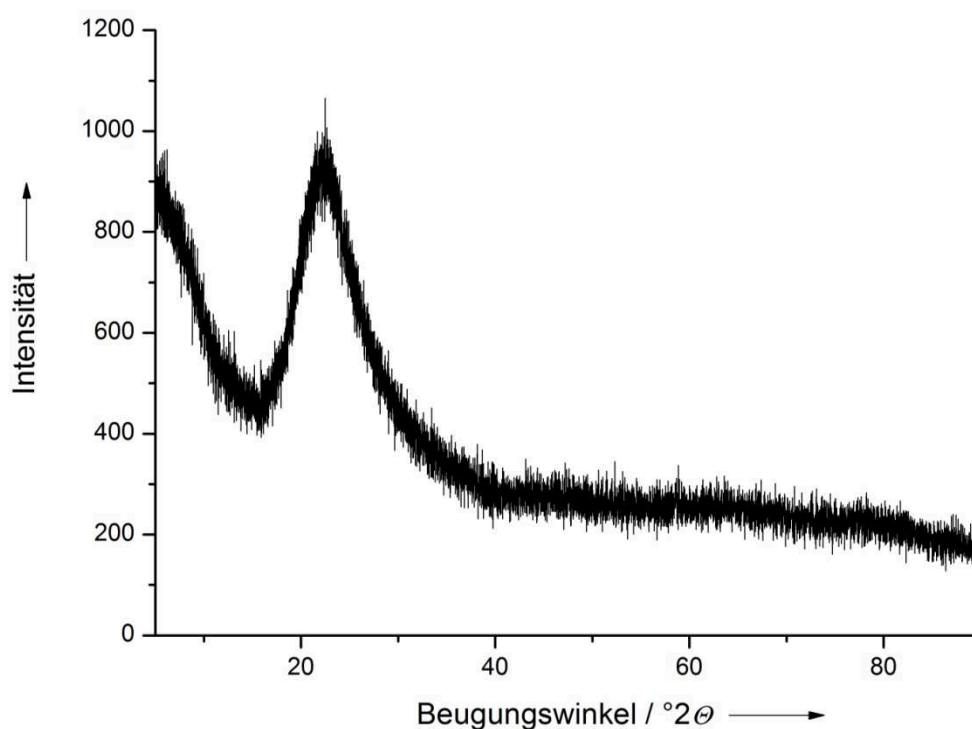


Abbildung 78: Röntgendiffraktogramm der Siliciumdioxid-Nanopartikel (Ludox[®] HS 30).

6.2.2. Morphologie der Partikel

Bei den Siliciumdioxid-Nanopartikeln handelt es sich um Partikel mit sphärischer Gestalt. Abbildung 79 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Partikel mit einer a) 500000-fachen und b) 260000-fachen Vergrößerung.

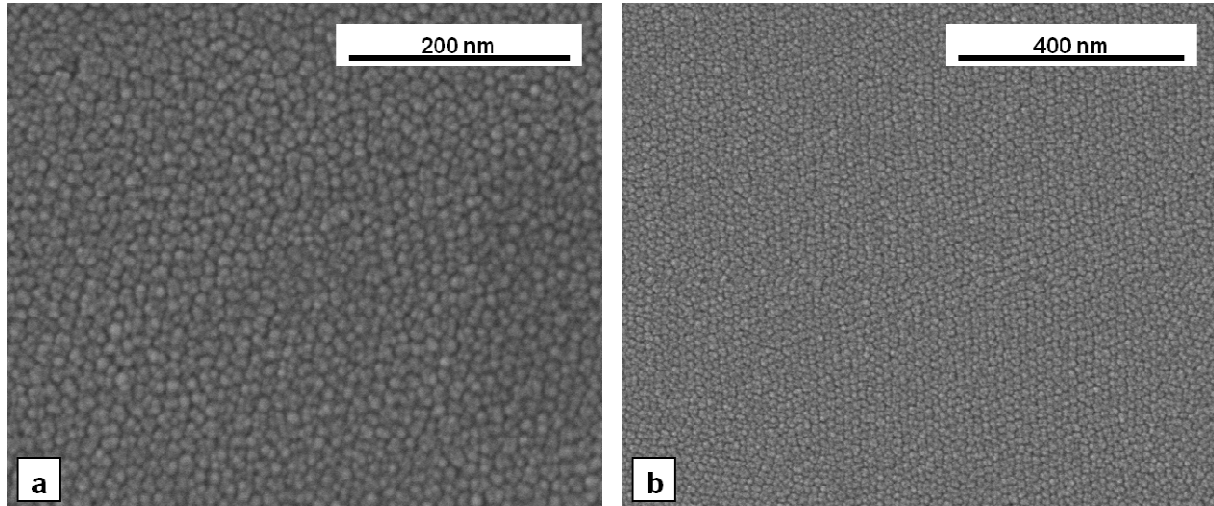


Abbildung 79: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Siliciumdioxid-Nanopartikel (Ludox[®] HS 30).

Man erkennt eine monodisperse Größenverteilung der Partikel, die auch in der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahme in Abbildung 80 zu erkennen ist.

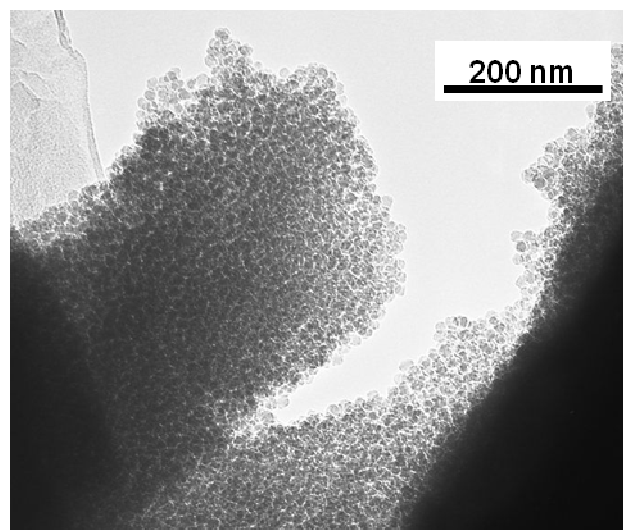


Abbildung 80: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Siliciumdioxid-Nanopartikel (Ludox[®] HS 30).

Während der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung der Partikel wurde ein EDX-Spektrum aufgenommen. Abbildung 81 zeigt das EDX-Spektrum der Siliciumdioxid-Nanopartikel.

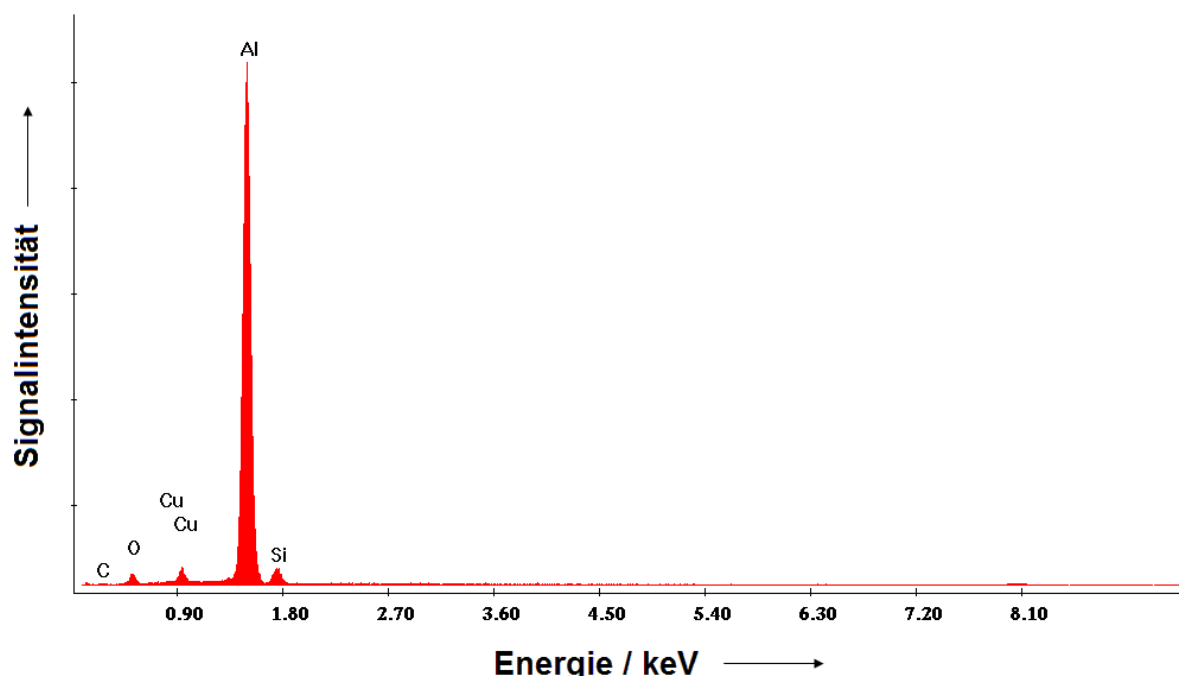


Abbildung 81: EDX-Spektrum der Siliciumdioxid-Nanopartikel (Ludox[®] HS 30).

Das Spektrum weist einen großen Peak für Aluminium auf und kleinere Signale für Kupfer, die dem Trägermaterial der Nanopartikel zuzuordnen sind. Daneben sind die Signale für Sauerstoff bei weniger als 1 keV und das Signal für Silicium bei etwa 1,8 keV zu erkennen, dies sind die entsprechenden Signale des Siliciumdioxids.

Zur weiteren Charakterisierung der Partikel wurde ein IR-Spektrum aufgenommen, die Probe wurde nach der ATR-Methode (abgeschwächte Totalreflexion) vermessen. Die wichtigsten charakteristischen Banden sind in Tabelle 13 dargestellt und den vorhandenen funktionellen Gruppen zugeordnet.

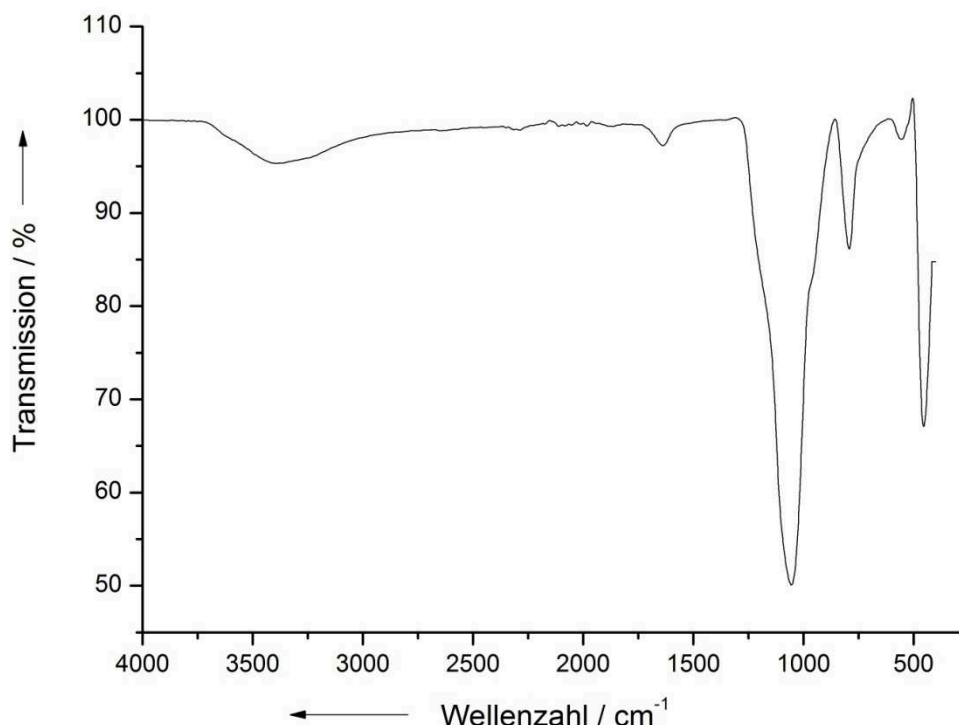


Abbildung 82: IR-Spektrum der Siliciumdioxid-Nanopartikel (Ludox® HS 30) nach der ATR-Methode.

Tabelle 13: Zuordnung der Wellenzahlen des IR-Spektrums der Siliciumdioxid-Nanopartikel (Ludox® HS 30).

Zuordnung	Wellenzahl in cm^{-1}
H ₂ O - adsorbiert	3387
H ₂ O - adsorbiert	1638
Si-O	1055
Si-O	792

6.3. Charakterisierung der mit Sulfonsäuregruppen funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel

6.3.1. Größe der Partikel

In diesem Abschnitt erfolgt die Charakterisierung der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel. Nach der Synthese der funktionalisierten Partikel wurde die Größenverteilung des kolloid-dispersen Systems ermittelt. Abbildung 83 zeigt die durch analytische Scheibenzentrifugation ermittelte Größenverteilung der funktionalisierten Nanopartikel.

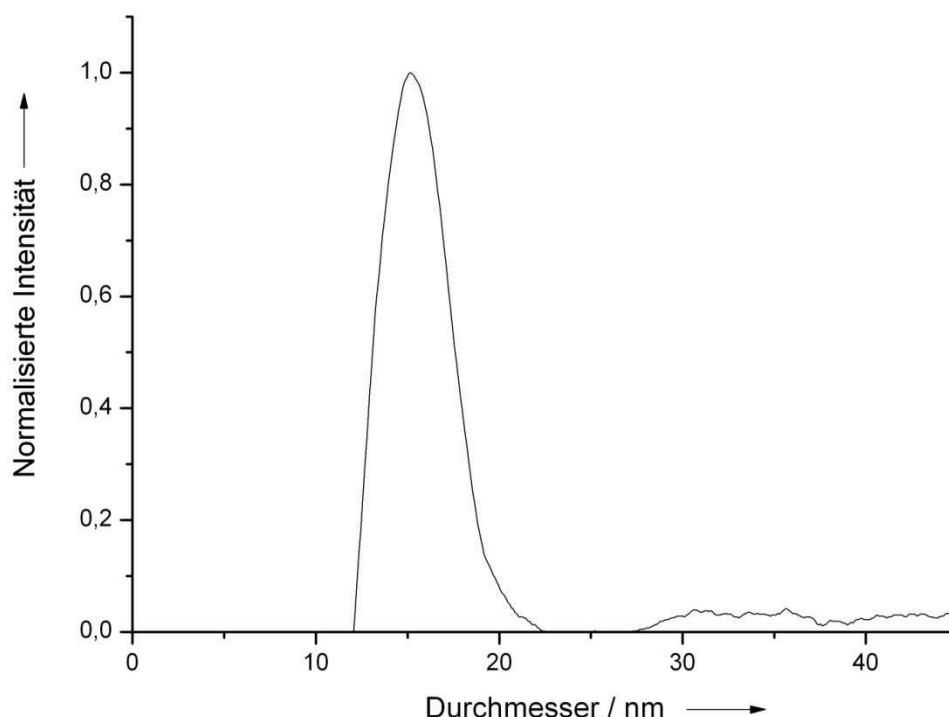


Abbildung 83: Mittels analytischer Scheibenzentrifugation bestimmte Größenverteilung der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel.

Die Größenverteilung ist etwas enger als bei den unfunktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikeln, auch hier finden sich wenige Agglomerate bei höheren Partikeldurchmessern. Das Maximum selbst ist nur unwesentlich verändert.

6.3.2. Morphologie der Partikel

Die funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht, die sphärische Gestalt der Partikel zeigt sich auch hier. Abbildung 84 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel bei einer a) 200000-fachen und b) 200000-fachen Vergrößerung. Man erkennt wieder die monodisperse Größenverteilung der Partikel. Die Partikel selbst sollten sich auch durch die Oberflächenfunktionalisierung nicht in ihrer Gestalt verändern. Insgesamt wirken die Partikel durch die Funktionalisierung etwas „diffuser“.

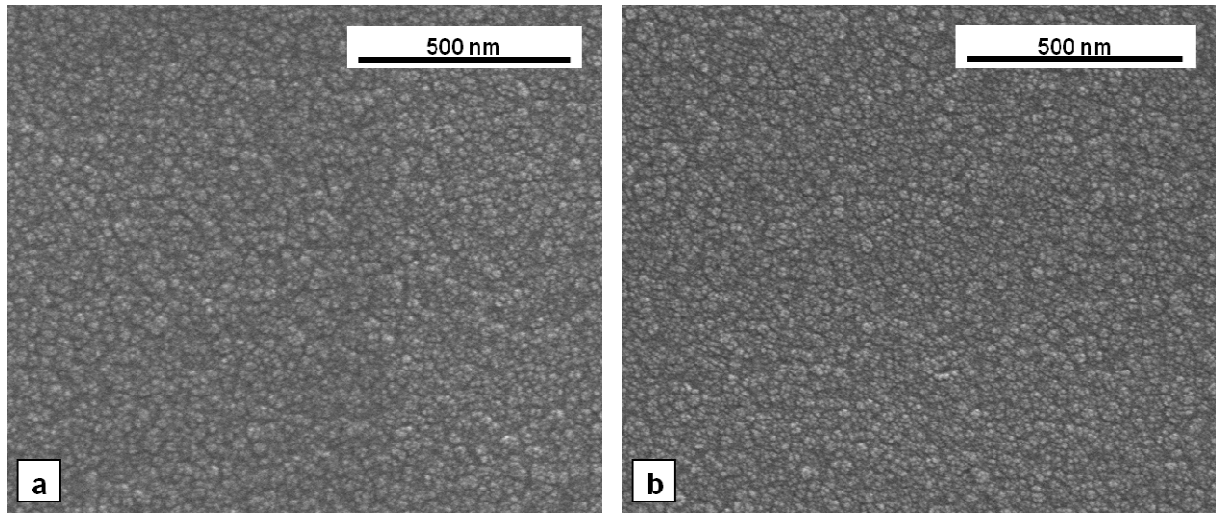


Abbildung 84: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel.

Abbildung 85 zeigt eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel, auf der die homogene Größenverteilung der Teilchen zu erkennen ist.

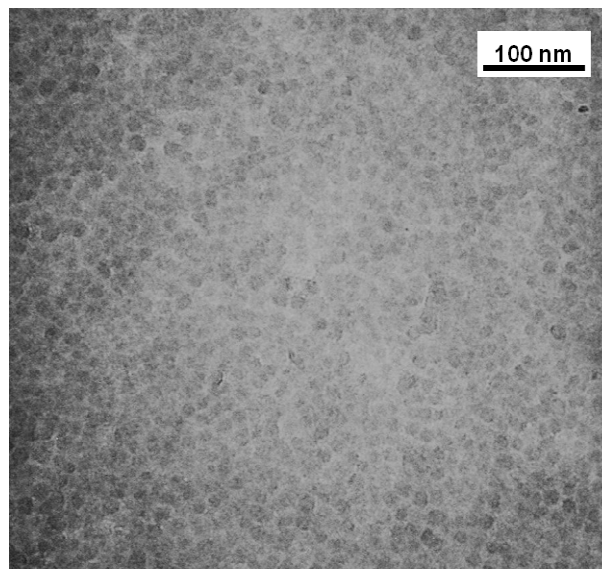


Abbildung 85: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel.

Während der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung der funktionalisierten Partikel wurde ein EDX-Spektrum aufgenommen. Abbildung 86 zeigt das EDX-Spektrum der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel.

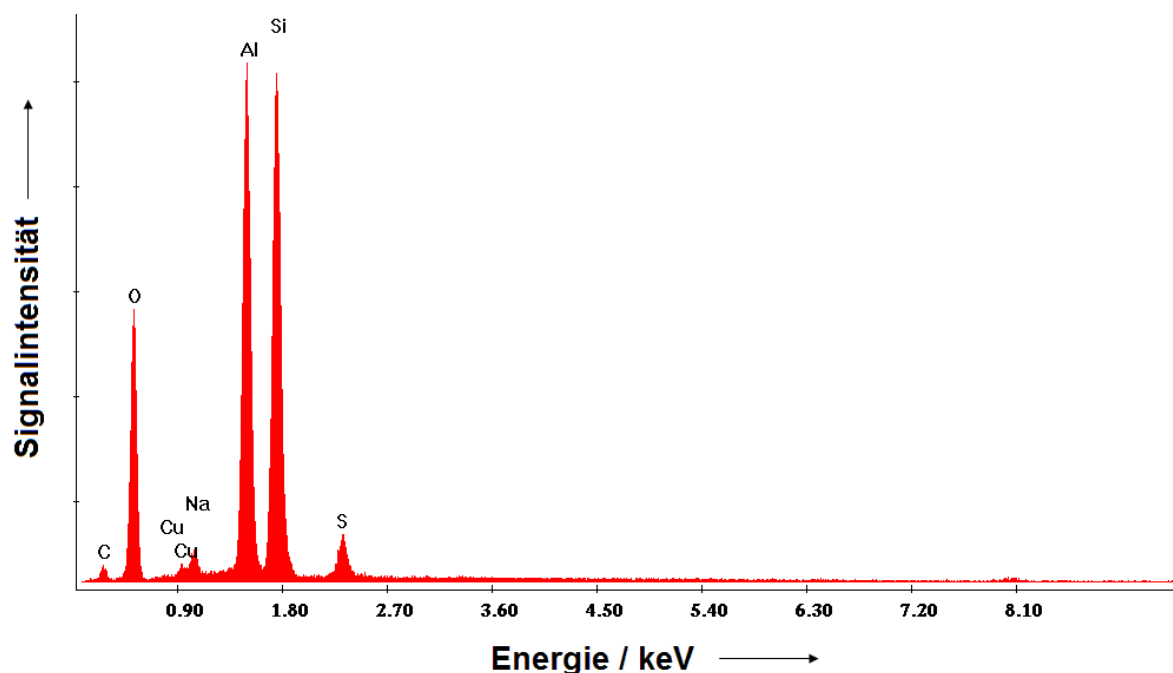


Abbildung 86: EDX-Spektrum der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel.

Das Spektrum weist einen großen Peak für Aluminium auf und kleinere Signale für Kupfer, die dem Trägermaterial der Nanopartikel zuzuordnen sind. Daneben sind die Signale für Sauerstoff bei weniger als 1 keV und das Signal für Silicium bei ca. 1,8 keV zu erkennen, dies sind wieder die entsprechenden Signale des Siliciumdioxids. Darüber hinaus findet sich ein Signal von Natrium, das aus der Lösung stammt. Es ist ein weiteres Signal für Schwefel bei weniger als 2,7 keV zu erkennen, ebenso wie ein Signal für Kohlenstoff bei weniger als 0,9 keV. Die Signale für Schwefel und für Kohlenstoff sind der Oberflächenfunktionalisierung der Partikel zuzuordnen.

Zur weiteren Charakterisierung der funktionalisierten Partikel wurde ein IR-Spektrum aufgenommen, die Probe wurde wieder nach der ATR-Methode (abgeschwächte Totalreflexion) vermessen. Die wichtigsten charakteristischen Banden sind in Tabelle 14 dargestellt und den vorhandenen funktionellen Gruppen zugeordnet.

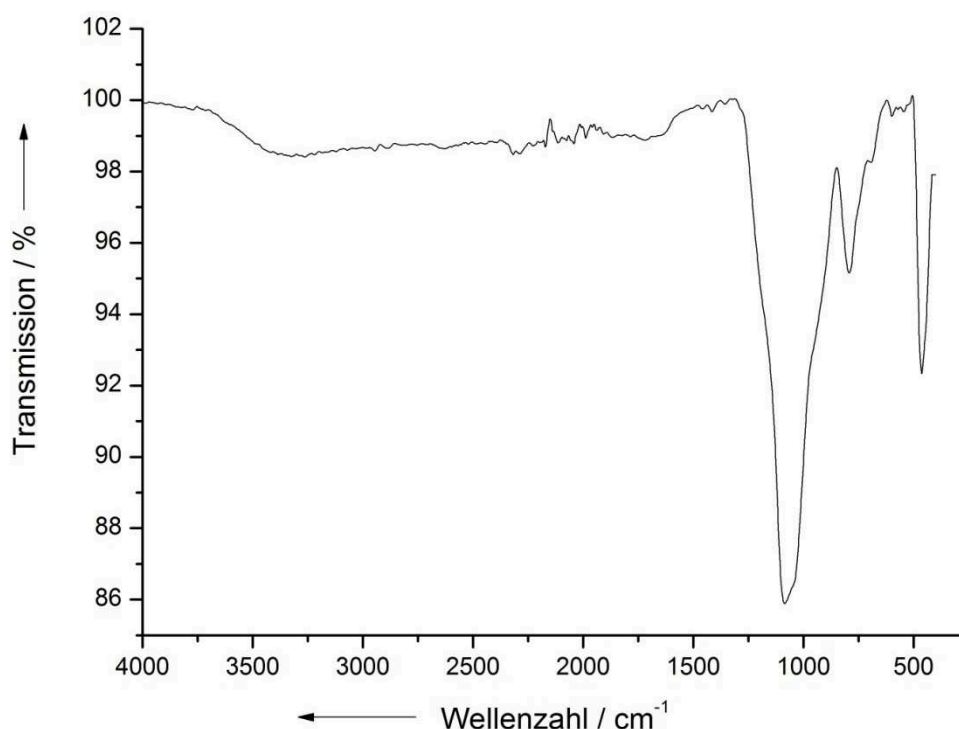


Abbildung 87: IR-Spektrum der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel nach der ATR-Methode.

Tabelle 14: Zuordnung der Wellenzahlen des IR-Spektrums der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel.

Zuordnung	Wellenzahl in cm^{-1}
H_2O - adsorbiert	3263
Si-O	1084
Si-O	792

Abbildung 87 zeigt das IR-Spektrum der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel nach der ATR-Methode. Die Funktionalisierung der Nanopartikel ist im Spektrum nicht eindeutig zu erkennen.

6.4. Oberflächenchemie und kolloidale Eigenschaften

In diesem Kapitel werden weitere Untersuchungen an den funktionalisierten und unfunktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikeln beschrieben. Als Ausgangspunkt für die Adsorptionsexperimente dienen die funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel. Zunächst wurde die kolloidale Stabilität der funktionalisierten Partikel untersucht,

dazu wurden die Partikel mit der dynamischen Lichtstreuung einmal direkt nach der Synthese vermessen und einmal nach 14 Tagen Lagerung. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 88 gezeigt. Die beiden Graphen zeigen die Größenverteilung der funktionalisierten Partikel nach der Streulichtintensität. Der rote Graph zeigt die Partikel direkt nach der Synthese, der blaue Graph zeigt die Partikel nach 14 Tagen Lagerung.

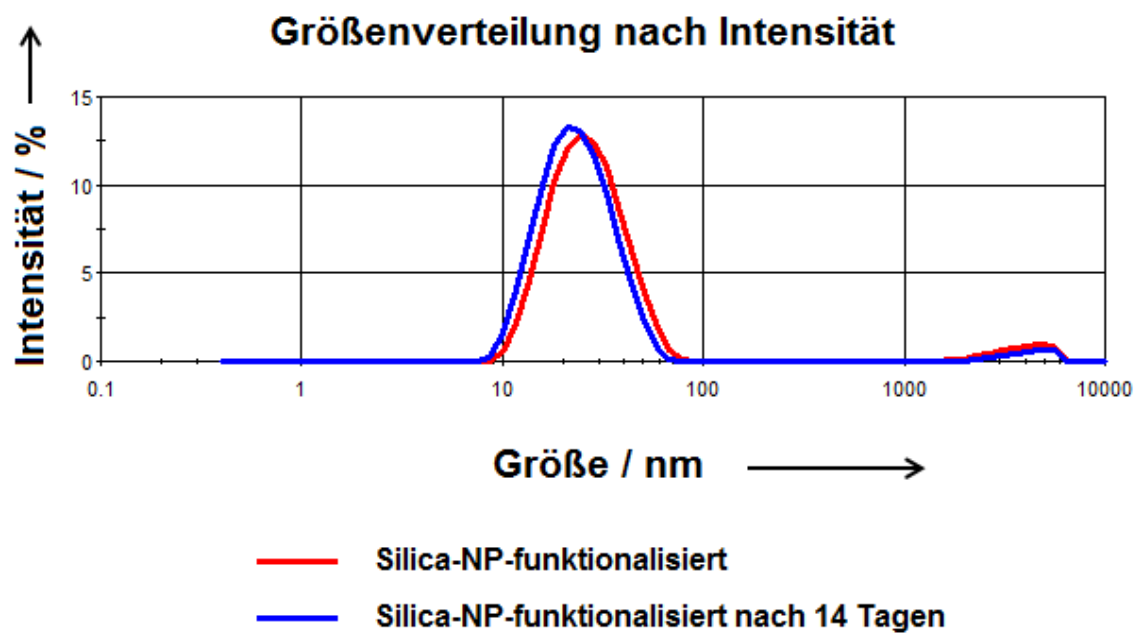


Abbildung 88: Mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel direkt nach der Synthese (rot) und nach 14 Tagen Lagerung (blau).

Die mittlere Größe der Partikel wird als Z-Average angegeben, dabei entsprechen die Angaben dem hydrodynamischen Durchmesser der Partikel. Dieser umfasst neben dem Siliciumdioxidkern auch die Funktionalisierung und die entsprechende Solvathülle der Teilchen. Der Z-Average liegt im Fall der frisch synthetisierten Partikel bei ca. 25 nm mit einem Polydispersitätsindex von 0,227. Für die 14 Tage gelagerten Partikel ergibt sich ein Z-Average von ca. 22 nm mit einem Polydispersitätsindex von 0,196. Folglich kann in beiden Fällen, laut der dynamischen Lichtstreuung, von einem monodispersen System ausgegangen werden. Die Größe der Partikel hat sich nicht wesentlich verändert, gleiches gilt für

den Polydispersitätsindex. Die funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel sind somit innerhalb des Beobachtungszeitraumes kolloidal stabil geblieben.

Als nächstes wurde das Verhalten der funktionalisierten Partikel in einer PBS-Lösung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht. Hierbei wurden der Z-Average, der Polydispersitätsindex und das Zetapotential der funktionalisierten Partikel erfasst. Für die Untersuchungen wurden 200 μL der funktionalisierten Partikel-Dispersion mit 1 mL PBS-Lösung vermischt und bei 37 °C inkubiert, dann wurde ein Teil der Probe entnommen und ungereinigt mit der dynamischen Lichtstreuung vermessen. Abbildung 89 zeigt die Veränderung des Z-Average und des Polydispersitätsindexes der Teilchen in Abhängigkeit von der Zeit.

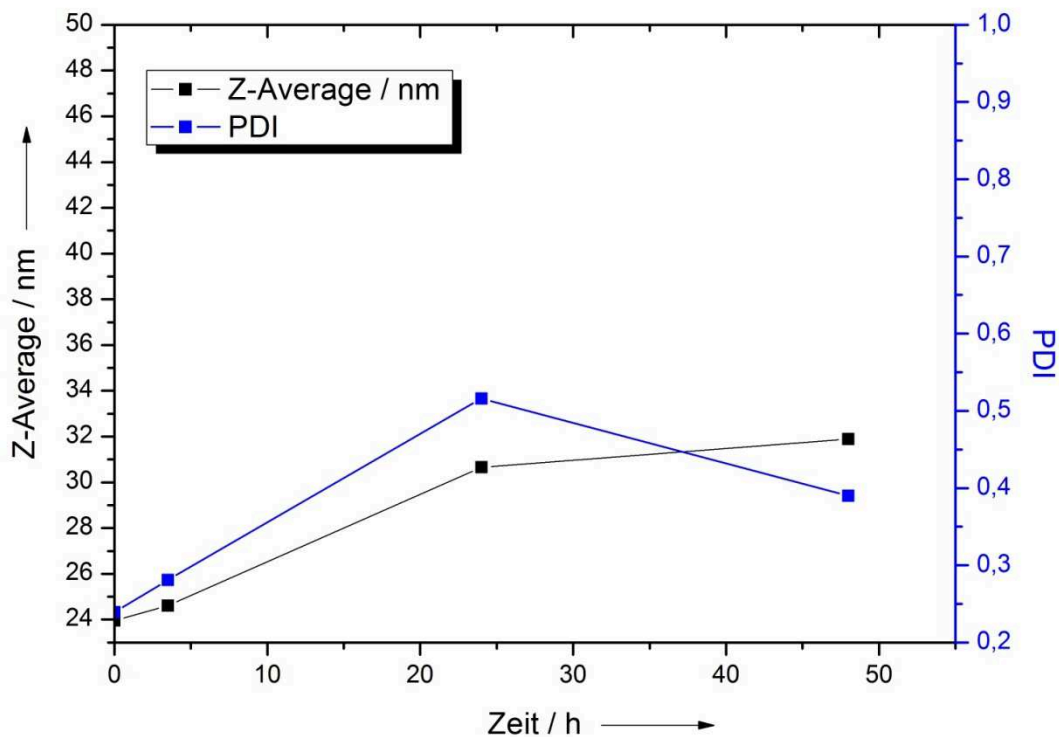


Abbildung 89: Mittels dynamischer Lichtstreuung gemessene Veränderung des Z-Average und des Polydispersitätsindex bei der Inkubation in PBS-Lösung der funktionalisierten Partikel in Abhängigkeit von der Zeit.

Kommen die funktionalisierten Partikel in Kontakt mit der Pufferlösung, so kommt es zu einer leichten Erhöhung des Z-Average sowie zu einer Erhöhung des Polydispersitätsindexes. Das System wird vermutlich aufgrund der Salzkonzentration

instabiler. Abbildung 90 zeigt die Veränderung des Zetapotentials der Teilchen in Abhängigkeit von der Zeit.

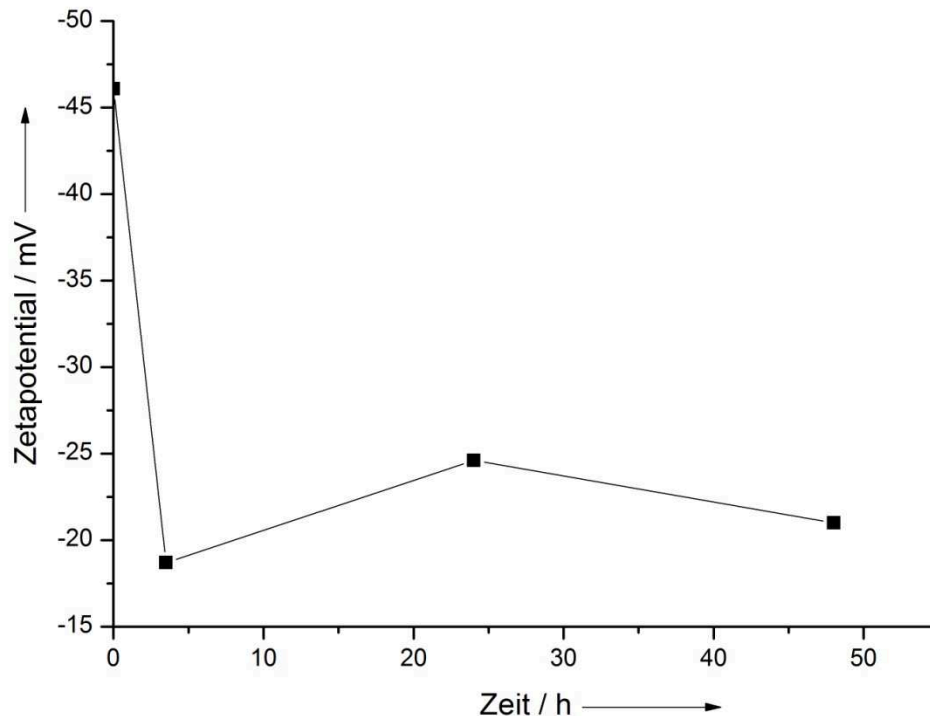


Abbildung 90: Veränderung des Zetapotentials der funktionalisierten Partikel bei der Inkubation in PBS-Lösung in Abhängigkeit von der Zeit.

Sobald die funktionalisierten Partikel in Kontakt mit der PBS-Lösung kommen, kommt es zu einer Abnahme des Zetapotentials. Unmittelbar nach der Synthese der funktionalisierten Partikel ist ein stark negatives Zetapotential, bedingt durch die Anwesenheit von Sulfonsäuregruppen auf der Oberfläche der Partikel, zu beobachten. Durch das negative Zetapotential besitzen die Partikel eine gute elektrostatische Stabilisierung. Beim Kontakt mit dem PBS-Puffer kommt es zu einer Abnahme des Betrags des Zetapotentials auf unter -30 mV, hierdurch kommt es zu einer Verminderung der elektrostatischen Stabilisierung der Partikel. Generell sind Siliciumdioxidoberflächen verhältnismäßig komplex, der Einfluss auf die Stabilität von Dispersionen ist abhängig von Salzkonzentration, pH-Wert und Oberflächenladung etc. Von METIN *et al.* wurden beispielsweise Untersuchungen zur Stabilität von nanopartikulären Silica-Dispersionen beschrieben.^[268] Hier wurde der Einfluss von pH-Wert, Temperatur und Salzkonzentration auf die Stabilität von Silica-

Nanopartikeln untersucht und gezeigt, dass Siliciumdioxid-Nanopartikel durch den Einfluss von Salzen ab einer gewissen Konzentration aggregieren.

Um mehr über die Oberflächenchemie der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel zu erfahren, wurden die Partikel titriert. Hierbei wurden die reinen und die funktionalisierten Partikel in Abhängigkeit ihres pH-Wertes entweder mit 0,1-molarer HCl oder NaOH titriert. Anschließend wurde die Dispersion noch einmal mit 0,1-molarer HCl bzw. NaOH rüchtitriert. Aus diesen Untersuchungen wurden dann die Anzahl der Oberflächenladungen abgeschätzt. Durch die Kenntnis der beteiligten Konzentrationen und der gesamten Oberfläche des Systems konnte dann die Anzahl der Ladungen ausgerechnet werden. Für die Bestimmung des Äquivalenzpunktes der Titrationskurve wurde zunächst die zweite Ableitung durch das Computerprogramm Origin erstellt. Im Bereich des erwarteten Wendepunktes sollte die zweite Ableitung eine Nullstelle aufweisen. Im nächsten Schritt kann der Verbrauch der Maßlösung dann grafisch aus der zweiten Ableitung abgelesen und die Oberflächenladungen entsprechend abgeschätzt werden. Abbildung 91 zeigt die Titrationskurve der reinen Siliciumdioxid-Nanopartikel (Ludox[®] HS 30) mit einer 0,1-molaren Salzsäurelösung.

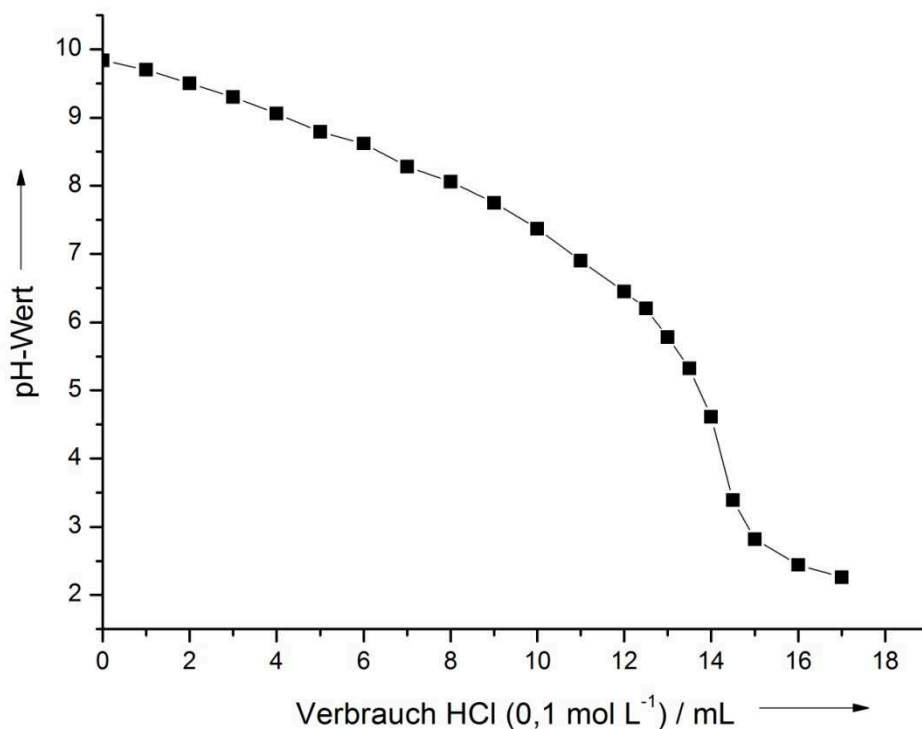


Abbildung 91: Titrationskurve der Silica-Nanopartikel (Ludox[®] HS 30).

Abbildung 92 zeigt die Rücktitration der reinen Siliciumdioxid-Nanopartikel (Ludox[®] HS 30) mit einer 0,1-molaren Natriumhydroxidlösung.

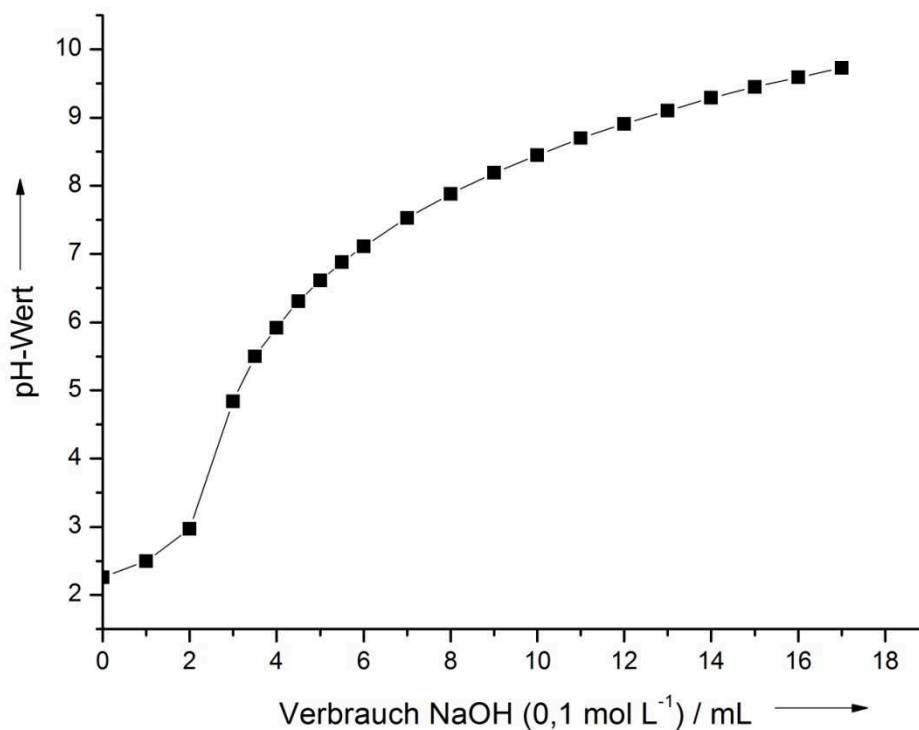


Abbildung 92: Rücktitration der reinen Siliciumdioxid-Nanopartikel (Ludox[®] HS 30).

Für die oberflächenfunktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel wurde in gleicher Weise verfahren. Aufgrund der Acidität der Sulfonsäuregruppen wurde die Titration im Säuren begonnen, im Gegensatz zu den unfunktionalisierten Partikeln, deren Dispersion einen pH-Wert von ungefähr 10 aufweist. Abbildung 93 zeigt die Titrationskurve der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel mit einer 0,1-molaren Natriumhydroxidlösung. Abbildung 94 zeigt die Rücktitration der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel mit einer 0,1-molaren Salzsäurelösung.

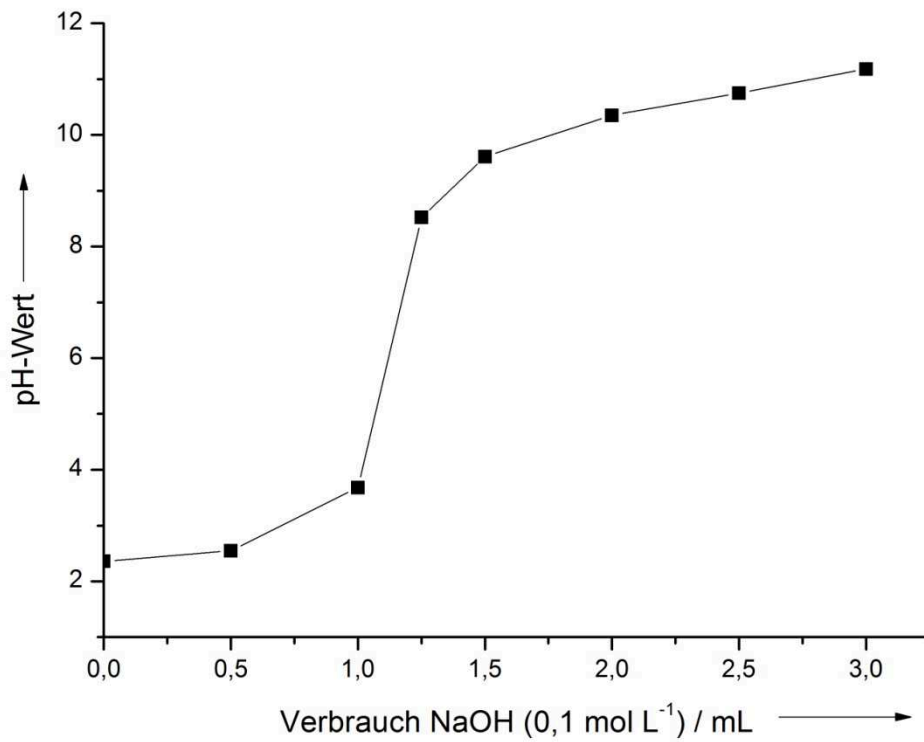


Abbildung 93: Titrationskurve der funktionalisierten Silica-Nanopartikel.

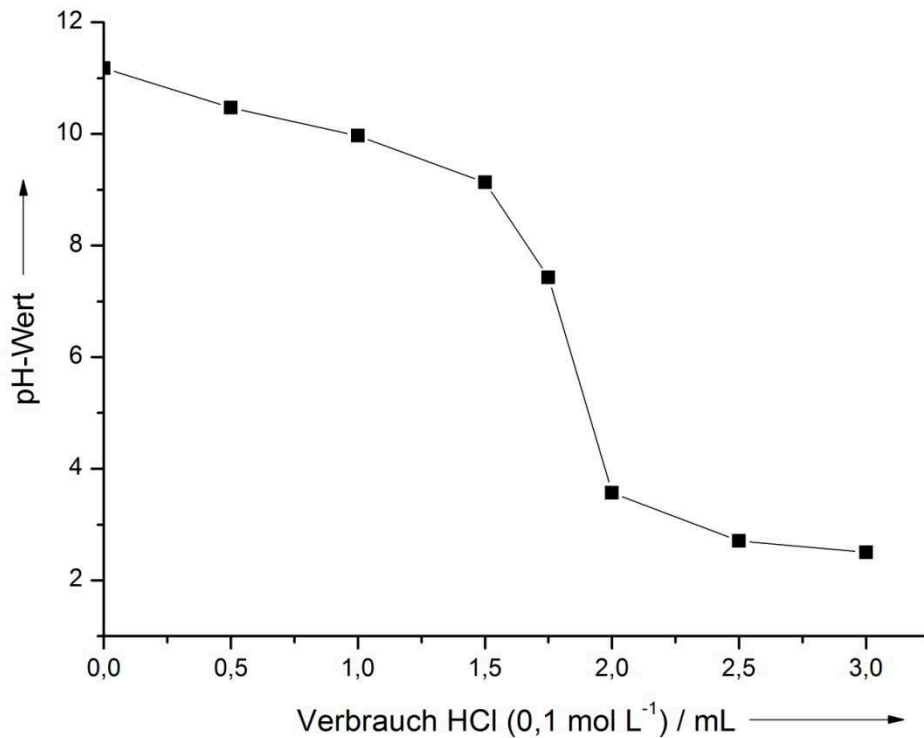


Abbildung 94: Rücktitration der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel.

Aus den erhaltenen Daten wurde dann die Anzahl der Ladungen auf der Oberfläche bestimmt. Im Fall der reinen Siliciumdioxid-Nanopartikel sind hierfür hauptsächlich die deprotonierten Silanolgruppen verantwortlich. Im Fall der funktionalisierten Partikel ist überwiegend die Sulfonsäuregruppe als ladungstragende Gruppe verantwortlich. Durch die Kenntnis der eingewogenen Masse an Siliciumdioxid, kann die Anzahl der Partikel und damit die Gesamtoberfläche des entsprechenden Systems berechnet werden. Tabelle 15 zeigt die Anzahl der Ladungen pro Oberflächeneinheit bei beiden Systemen.

Tabelle 15: Anzahl der Ladungen pro Oberflächeneinheit

Anzahl Ladungen	SiO ₂	SiO ₂ - funktionalisiert
Ladungen · m ⁻²	1,41 · 10 ¹⁸	2,85 · 10 ¹⁸
Ladung in Mol · m ⁻²	2,33 · 10 ⁻⁶	4,74 · 10 ⁻⁶
Ladungen · nm ⁻²	1,41	2,85

Die Anzahl der Ladungen pro Oberflächeneinheit wird auch als Silanolnummer bezeichnet.^[218] Für voll hydroxylierte Siliciumdioxidoberflächen werden in der Literatur Werte zwischen 4,6 OH-Gruppen nm⁻² und 4,9 OH-Gruppen nm⁻² – je nach Berechnungsgrundlage – genannt, dabei wird dieser Wert als eine Art Konstante betrachtet.^[218] Die experimentell ermittelten Werte (vgl. Tabelle 15) lagen etwas unter diesen Angaben, sie zeigen allerdings auch nur die deprotonierten Gruppen. Im Fall der reinen Siliciumdioxid-Nanopartikel fand sich ein Wert von 1,4 Ladungen pro Quadratnanometer und bei den funktionalisierten Partikeln ein Wert von 2,9 Ladungen pro Quadratnanometer. Bei den funktionalisierten Partikeln war der Wert damit doppelt so hoch wie bei den unfunktionalisierten Partikeln. Die Anzahl der titrierbaren Gruppen hat sich also durch die Funktionalisierung erhöht.

6.5. Adsorption an funktionalisierten Siliciumdioxid-Partikeln

Nach der Funktionalisierung der Siliciumdioxid-Nanopartikel wurde die Wechselwirkung der Teilchen mit dem kationischen Molekül Methylenblau (MB), mit Fluoresceinisothiocyanat markiertem bovinem Serumalbumin (FITC-BSA) und mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat markiertem bovinem Serumalbumin (TRITC-BSA) untersucht. Für die Berechnungen der adsorbierten Massen wurde ein mittlerer Partikeldurchmesser von 18 nm angenommen. Die Adsorption wurde für alle drei

Adsorptive mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmt. Hierzu wurden die Nanopartikel mit dem entsprechenden Adsorptiv für 24 h inkubiert (vgl. 4.2.2). Anschließend wurden die Partikel abzentrifugiert und der Überstand mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht, dabei entspricht die Menge im Überstand der nicht adsorbierten Menge des entsprechenden Adsorptivs. Die Auswertung der Absorptionsspektren erfolgte unter Zuhilfenahme von Kalibriergeraden, hierzu wurde für jedes Adsorptiv und jeden pH-Wert eine Kalibriergerade aufgenommen. Für die Erstellung einer Kalibriergeraden wurden unterschiedliche Konzentrationen des Adsorptivs vermessen. Abbildung 95 zeigt beispielsweise ein UV-Vis-Spektrum von FITC-BSA, bei dem der qualitative Verlauf der Absorptionsmaxima zu erkennen ist.

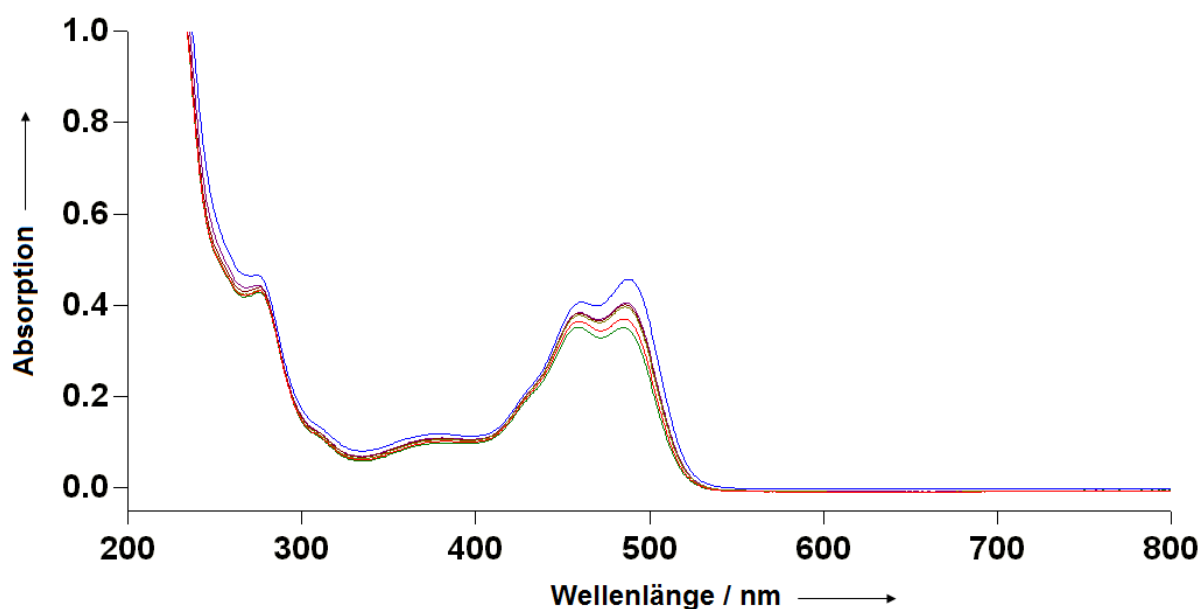


Abbildung 95: Qualitatives UV-Vis-Spektrum von FITC-BSA, das den qualitativen Verlauf der Absorptionsmaxima zeigt. Die einzelnen Graphen repräsentieren unterschiedliche Messungen.

Zum Vergleich zeigt Abbildung 96 ein UV-Vis-Spektrum von TRITC-BSA, bei dem der qualitative Verlauf der Absorptionsmaxima zu erkennen ist. Aus den ermittelten Daten wurden die Kalibriergeraden erstellt, Abbildung 97 und 98 zeigen beispielsweise die Kalibriergeraden von FITC-BSA und TRITC-BSA bei einem pH-Wert von 2. Die Kalibriergeraden stellen die Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration des Adsorptivs dar. Die Absorption ist dabei linear abhängig von den untersuchten Konzentrationen, wie aus den Geraden zu erkennen ist.

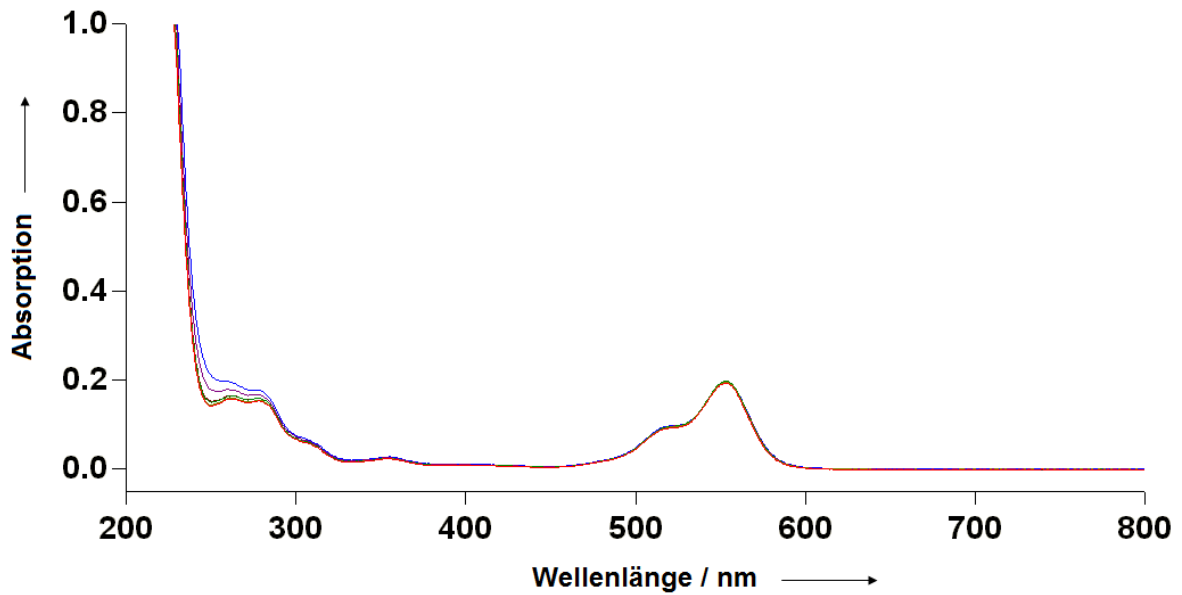


Abbildung 96: Qualitatives UV-Vis-Spektrum von FITC-BSA, das den qualitativen Verlauf der Absorptionsmaxima zeigt. Die einzelnen Graphen repräsentieren unterschiedliche Messungen.

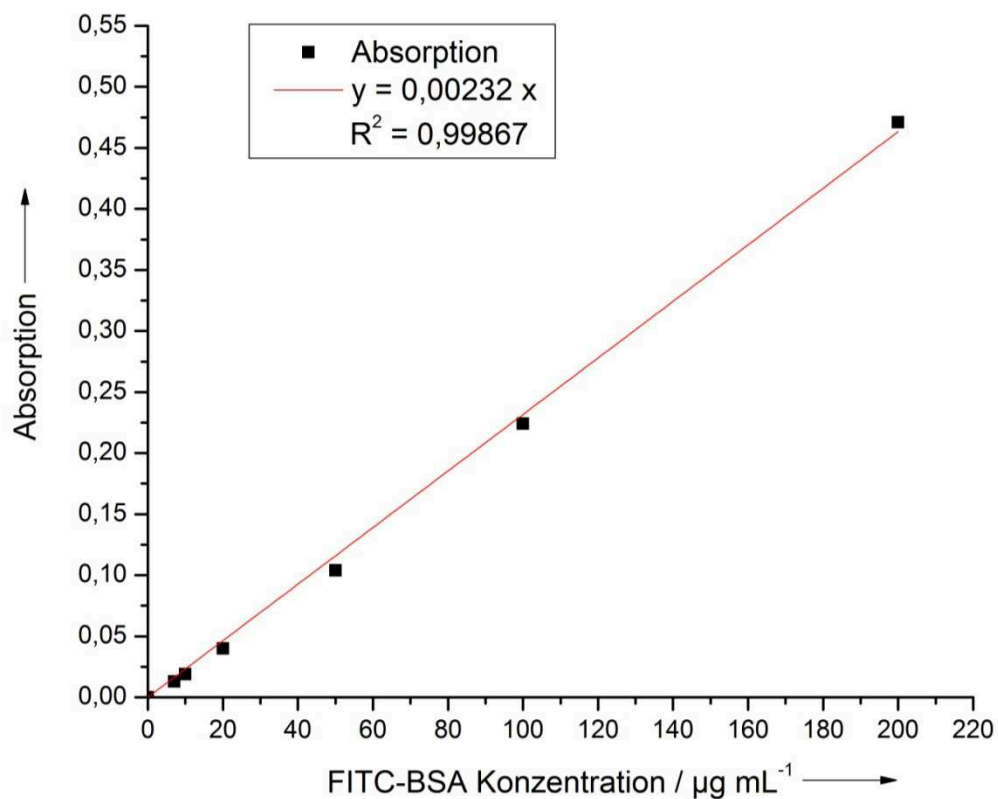


Abbildung 97: Kalibriergerade aus den gemessenen Absorptionen von FITC-BSA bei einem pH-Wert von 2.

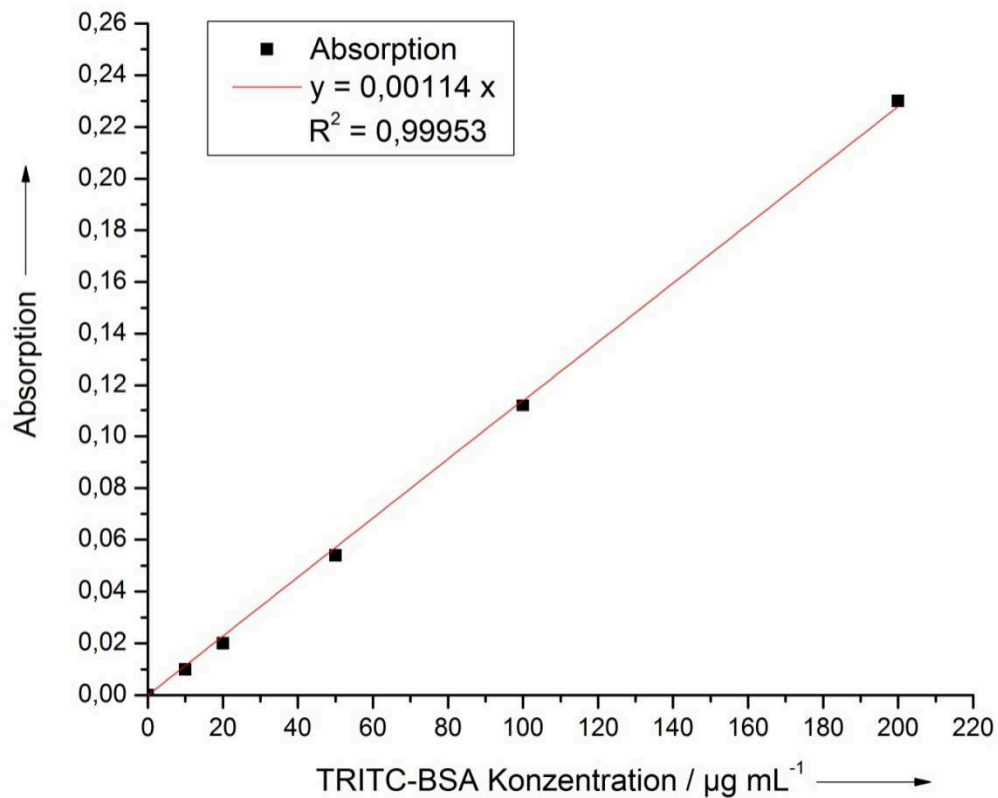


Abbildung 98: Kalibriergerade aus den gemessenen Absorptionen von TRITC-BSA bei einem pH-Wert von 2.

Die entsprechenden Versuchsansätze zeigen die charakteristischen Färbungen der Adsorptive, Abbildung 99 zeigt eine repräsentative, makroskopische Aufnahme.

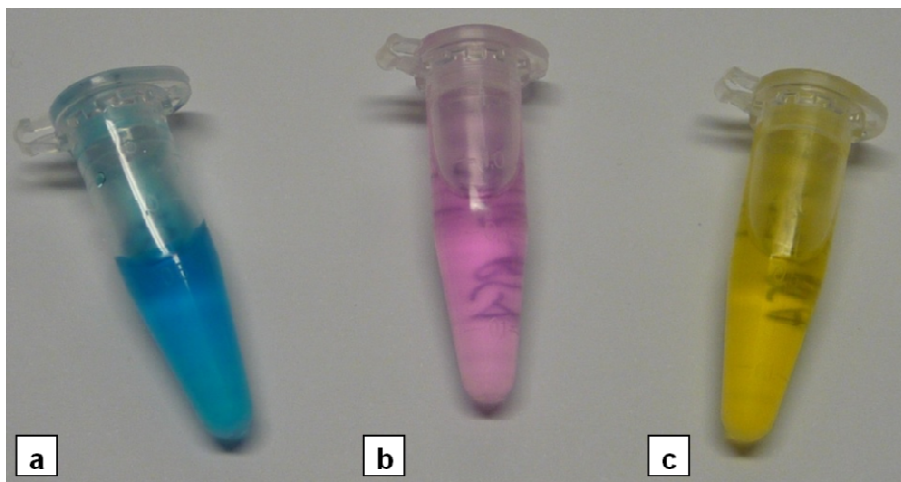


Abbildung 99: Makroskopische Aufnahmen der Partikel-Adsorptiv-Dispersionen: a) Methylenblau, b) TRITC-BSA und c) FITC-BSA.

6.5.1. Adsorption von Methylenblau bei einem pH-Wert von 2

Durch die Bestimmung der Adsorptivkonzentration im Überstand und der ursprünglich eingesetzten Adsorptivkonzentration kann die Konzentration der adsorbierten Spezies berechnet werden. Hieraus folgt die adsorbierte Masse in Prozent pro Reaktionsansatz, sie wurde in Abhängigkeit vom Adsorptiv-zu-Partikel-Massen-Verhältnis dargestellt. Des Weiteren wurde die adsorbierte Masse von Methylenblau, FITC-BSA und TRITC-BSA dividiert durch die Masse der sich im Reaktionsansatz befindenden Partikel bei den entsprechenden pH-Werten in Abhängigkeit vom Adsorptiv-zu-Partikel-Massen-Verhältnis ermittelt. Abbildung 100 zeigt die adsorbierte Masse von Methylenblau in Prozent bei einem pH-Wert von 2 in Abhängigkeit vom Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

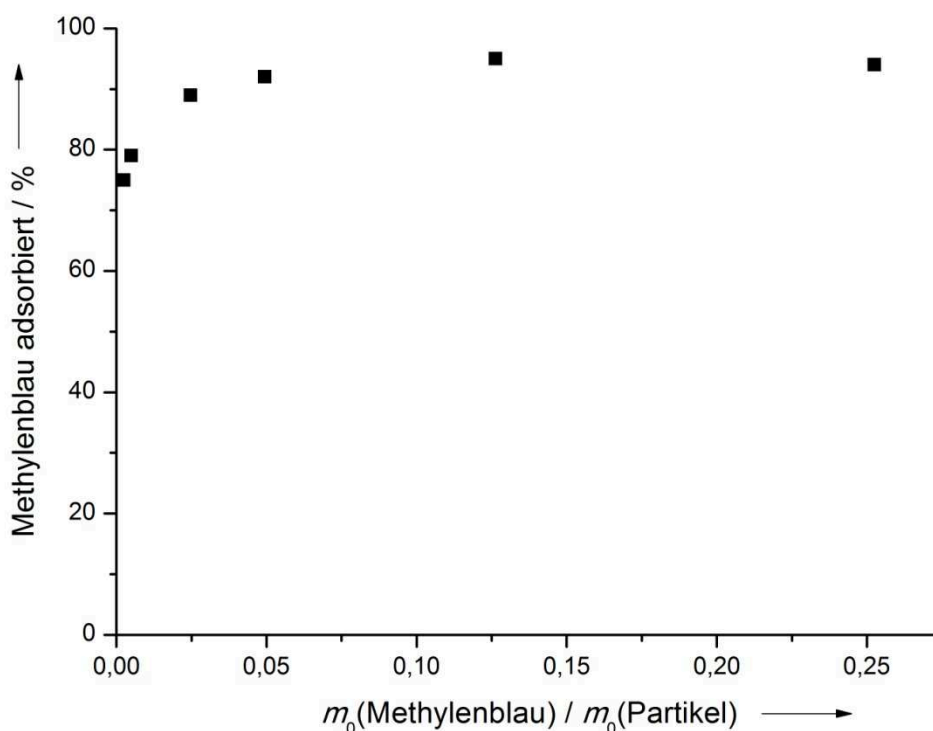


Abbildung 100: Adsorbierte Masse von Methylenblau in Prozent bei einem pH-Wert von 2 in Abhängigkeit vom Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

Für die Adsorption von Methylenblau zeigen sich Werte zwischen ca. 75 % und 90 %, dabei liegen die Werte bei allen Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnissen in einem ähnlichen Bereich. Abbildung 101 zeigt die adsorbierte Masse von Methylenblau dividiert durch die Masse der sich im Reaktionsansatz

befindenden Partikel bei einem pH-Wert von 2 in Abhängigkeit vom Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

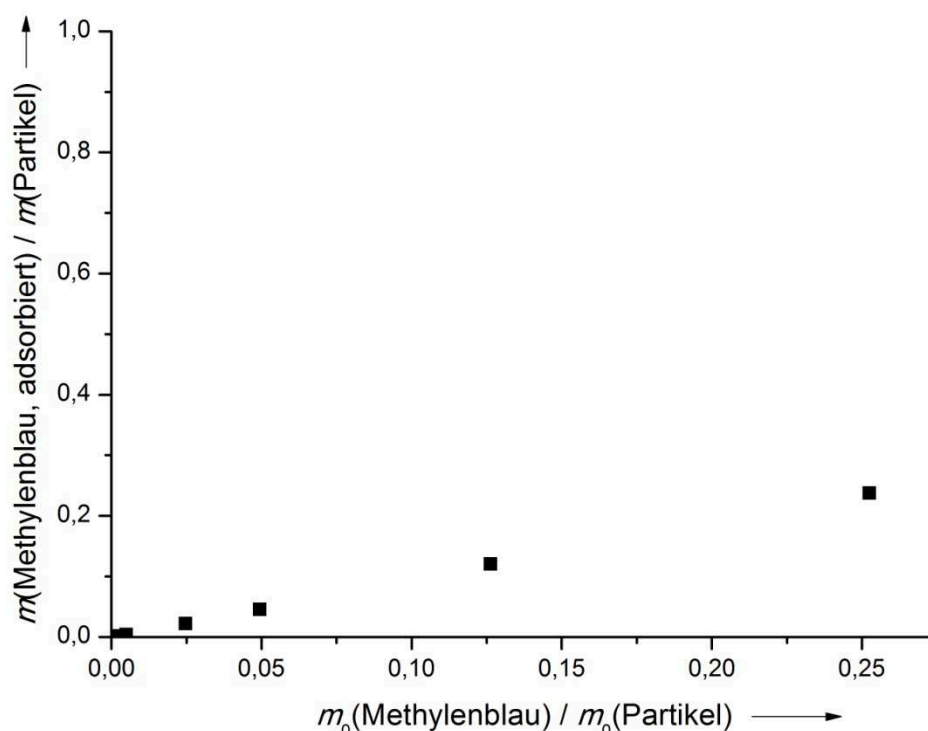


Abbildung 101: Adsorbierte Masse von Methylenblau dividiert durch die Masse der sich im Reaktionsansatz befindenden Partikel bei einem pH-Wert von 2 in Abhängigkeit vom Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

Es lässt sich ein grober linearer Zusammenhang zwischen dem Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnis und der Methylenblau-Adsorption beobachten. Mit steigendem Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnis erhöht sich die adsorbierte Masse des Farbstoffs.

6.5.2. Adsorption von Methylenblau bei einem pH-Wert von 7

Zum Vergleich wurde das Adsorptionsverhalten von Methylenblau bei einem pH-Wert von 7 untersucht. Abbildung 102 zeigt die adsorbierte Masse von Methylenblau in Prozent bei einem pH-Wert von 7 in Abhängigkeit vom Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

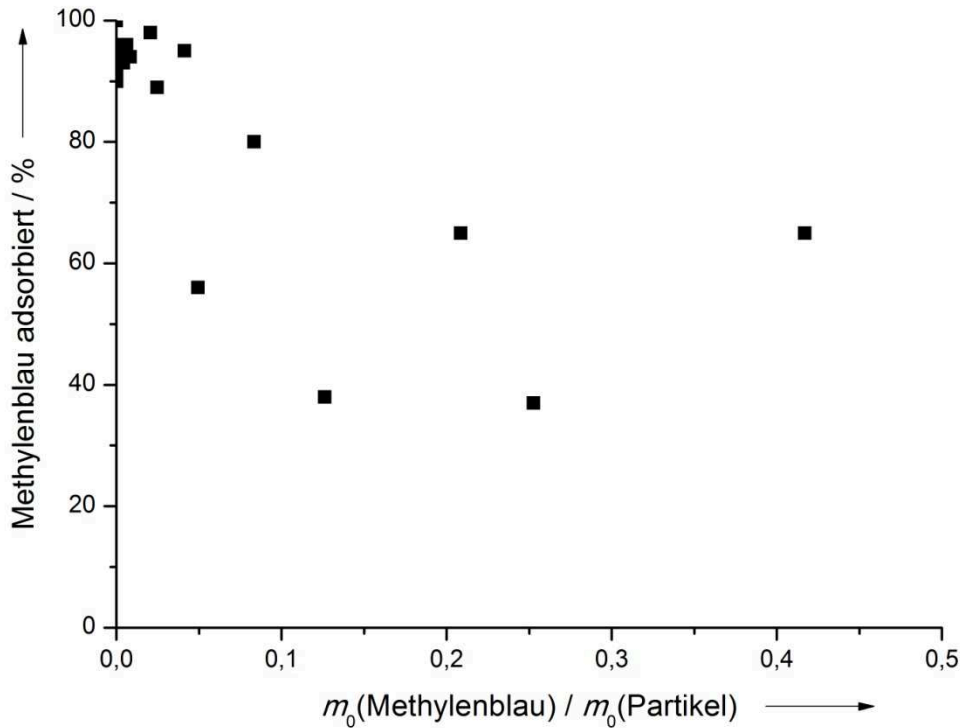


Abbildung 102: Adsorbierte Masse von Methylenblau in Prozent bei einem pH-Wert von 7 in Abhängigkeit vom Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

Für die Adsorption von Methylenblau bei einem pH-Wert von 7 zeigen sich Werte zwischen ca. 35 % und 95 % der ursprünglich im Reaktionsansatz vorhandenen Masse, dabei sind die Werte bei den einzelnen Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnissen unregelmäßig verteilt. Abbildung 103 zeigt die adsorbierte Masse von Methylenblau dividiert durch die Masse der sich im Reaktionsansatz befindenden Partikel bei einem pH-Wert von 7 in Abhängigkeit vom Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnis. Es lässt sich wieder ein grober linearer Zusammenhang zwischen dem Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnis und der Methylenblau-Adsorption beobachten. Mit steigendem Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnis erhöht sich die adsorbierte Masse des Farbstoffs. Die Adsorption von Methylenblau ist bei einem pH-Wert von 2 gegenüber der Adsorption bei einem pH-Wert von 7 leicht erhöht.

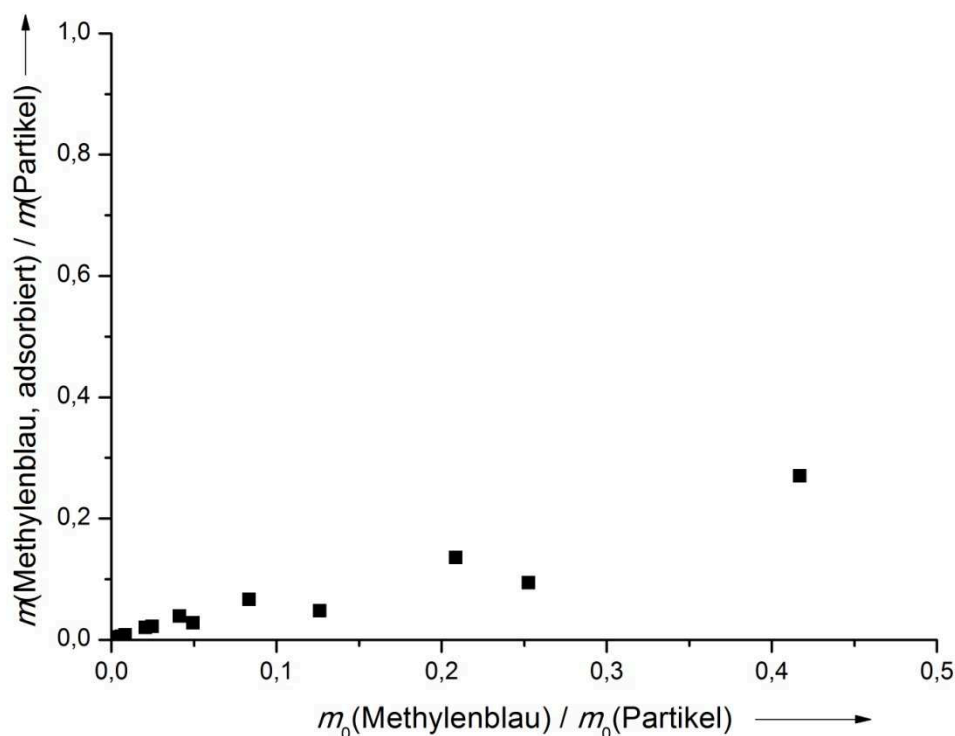


Abbildung 103: Adsorbierte Masse von Methylenblau dividiert durch die Masse der sich im Reaktionsansatz befindenden Partikel bei einem pH-Wert von 7 in Abhängigkeit vom Methylenblau-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

6.5.3. Adsorption von FITC-BSA bei einem pH-Wert von 2

In diesem Abschnitt wird das Adsorptionsverhalten von FITC-BSA an den funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikeln bei einem pH-Wert von 2 untersucht. Die Oberflächenchemie der funktionalisierten Partikel ist durch die Anwesenheit der Sulfonsäuregruppen geprägt und sollte sich bei den beiden untersuchten pH-Werten nicht wesentlich unterscheiden. Beim Serumalbumin spielt der isoelektrische Punkt des Proteins eine wichtige Rolle, hier heben sich die positiven und negativen Ladungen auf, er liegt bei einem pH-Wert zwischen 4,5 und 5,0. Unterhalb des isoelektrischen Punktes hat das Protein eine positive Nettoladung, oberhalb eine negative. Da die Partikel selbst eine negative Oberflächenladung haben, kann bei den Experimenten festgestellt werden, inwieweit die Ladung des Proteins die Adsorptionseigenschaften beeinflusst. Allerdings weist das Serumalbumin eine gewisse Pufferkapazität auf, darüber hinaus könnte der pH-Wert die Struktur des Proteins beeinflussen. BSA selbst ist ein großes Molekül mit einer molaren Masse von 67000 g mol^{-1} . Abbildung 104 zeigt die adsorbierte Masse von FITC-BSA in

Prozent bei einem pH-Wert von 2 in Abhängigkeit vom FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

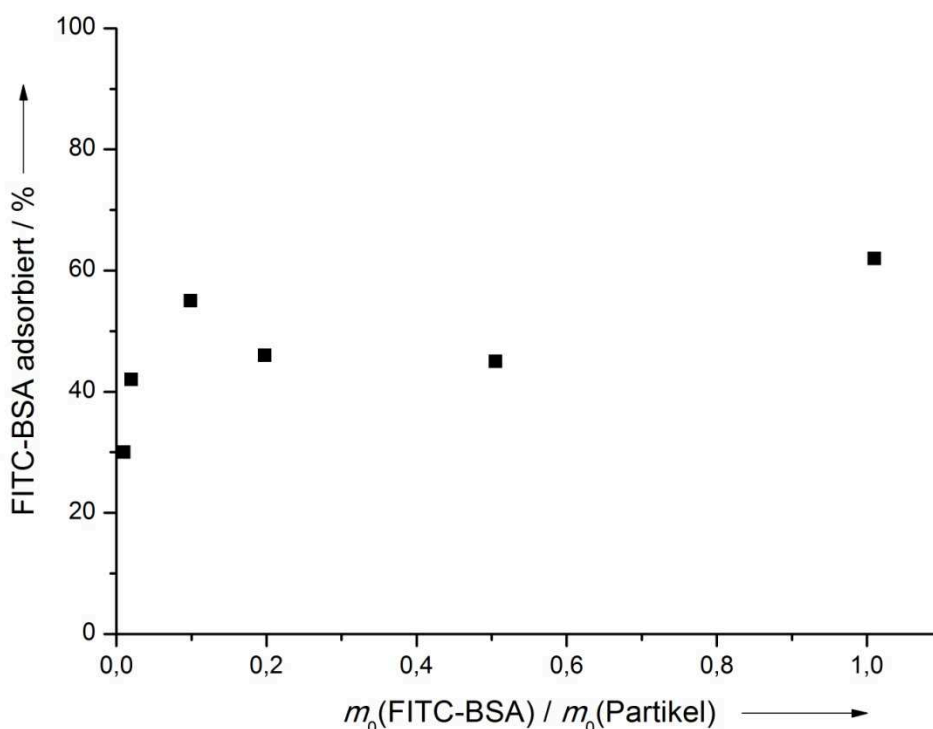


Abbildung 104: Adsorbierte Masse von FITC-BSA in Prozent bei einem pH-Wert von 2 in Abhängigkeit vom FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

Für die Adsorption von FITC-BSA zeigen sich Werte zwischen ca. 30 % und 60 % der ursprünglich im Reaktionsansatz vorhandenen Masse, dabei liegen die Werte bei allen FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnissen in diesem Bereich. Abbildung 105 zeigt die adsorbierte Masse von FITC-BSA dividiert durch die Masse der sich im Reaktionsansatz befindenden Partikel bei einem pH-Wert von 2 in Abhängigkeit vom FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis. Es lässt sich ein grober linearer Zusammenhang zwischen dem FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis und der FITC-BSA-Adsorption beobachten. Mit steigendem FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis erhöht sich die adsorbierte Masse des Farbstoffs.

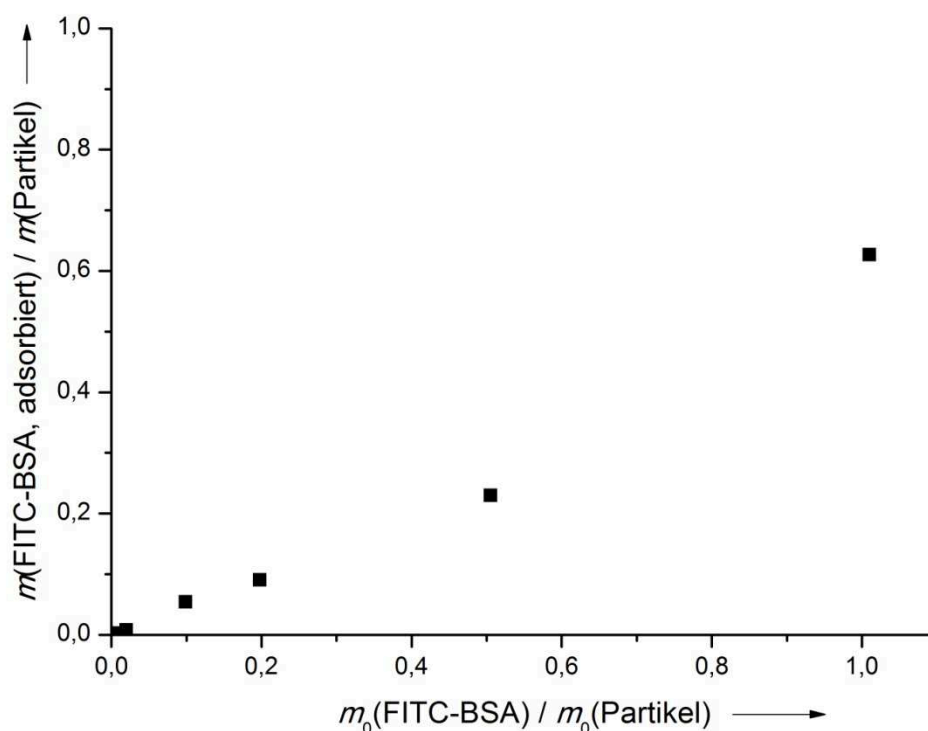


Abbildung 105: Adsorbierte Masse von FITC-BSA dividiert durch die Masse der sich im Reaktionsansatz befindenden Partikel bei einem pH-Wert von 2 in Abhängigkeit vom FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

6.5.4. Adsorption von FITC-BSA bei einem pH-Wert von 7

Im Folgenden wird der gleiche Versuch bei einem pH-Wert von 7 dargestellt. Abbildung 106 zeigt die adsorbierte Masse von FITC-BSA in Prozent bei einem pH-Wert von 7 in Abhängigkeit vom FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis. Für die Adsorption von FITC-BSA zeigen sich Werte zwischen ca. 1 % und 35 % der ursprünglich im Reaktionsansatz vorhandenen Masse, dabei liegen die Werte bei den FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnissen über 0,1 in einem ähnlichen Bereich. Bei einem Verhältnis kleiner als 0,1 nimmt die prozentuale Adsorption deutlich ab. Insgesamt ist die prozentuale Adsorption von FITC-BSA gegenüber den Werten bei einem pH-Wert von 2 verringert. Abbildung 107 zeigt die adsorbierte Masse von FITC-BSA dividiert durch die Masse der sich im Reaktionsansatz befindenden Partikel bei einem pH-Wert von 7 in Abhängigkeit vom FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis. Es lässt sich wieder ein grober linearer Zusammenhang zwischen dem FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis und der FITC-BSA-Adsorption beobachten. Mit steigendem FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis erhöht sich die adsorbierte Masse des Farbstoffs.

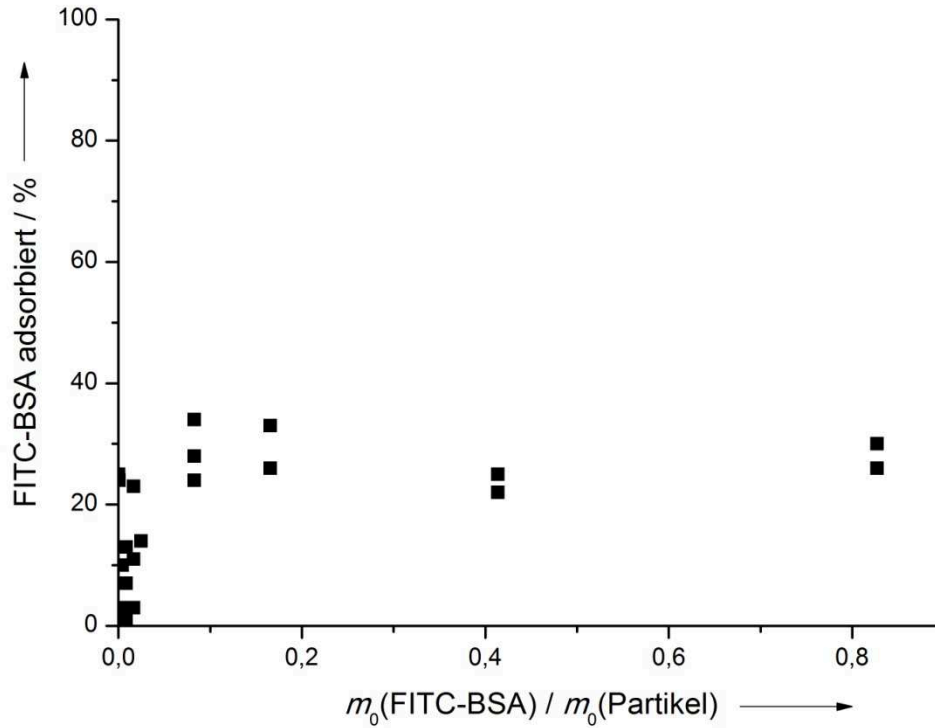


Abbildung 106: Adsorbierte Masse von FITC-BSA in Prozent bei einem pH-Wert von 7 in Abhängigkeit vom FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

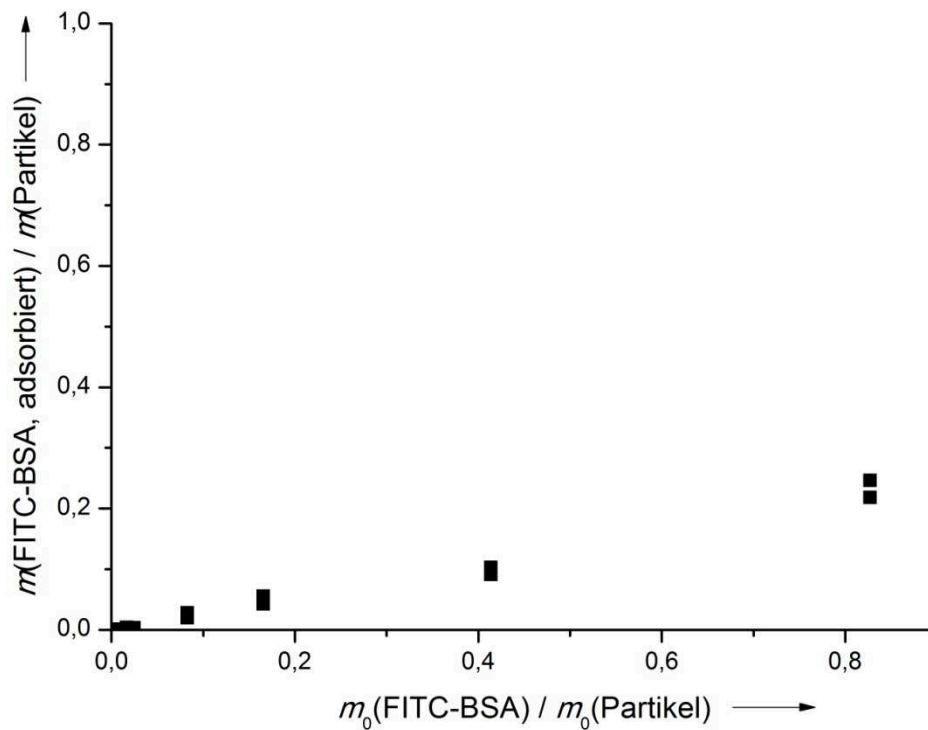


Abbildung 107: Adsorbierte Masse von FITC-BSA dividiert durch die Masse der sich im Reaktionsansatz befindenden Partikel bei einem pH-Wert von 7 in Abhängigkeit vom FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

Die Adsorption von FITC-BSA fällt bei einem pH-Wert von 2 gegenüber der Adsorption bei einem pH-Wert von 7 stärker aus.

6.5.5. Adsorption von TRITC-BSA bei einem pH-Wert von 2

Zum Schluss erfolgte die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von TRITC-BSA an den funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikeln. Der Unterschied zwischen TRITC-BSA zum FITC-BSA besteht in der fluoreszierenden Gruppe am Albumin. Zum Vergleich wurden die Adsorptionsexperimente daher sowohl mit FITC- als auch mit TRITC-BSA durchgeführt. Abbildung 108 zeigt die adsorbierte Masse von TRITC-BSA in Prozent bei einem pH-Wert von 2 in Abhängigkeit vom TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

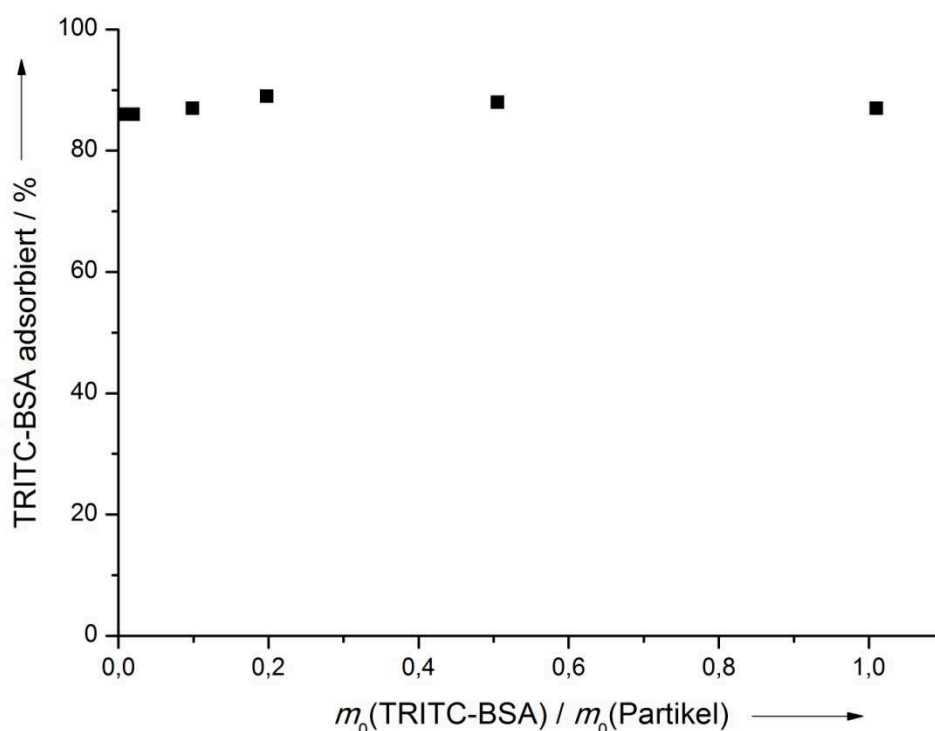


Abbildung 108: Adsorbierte Masse von TRITC-BSA in Prozent bei einem pH-Wert von 2 in Abhängigkeit vom TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

Für die Adsorption von TRITC-BSA zeigen sich Werte zwischen ca. 85 % und 90 % der ursprünglich im Reaktionsansatz vorhandenen Masse, dabei liegen die Werte bei allen TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnissen in einem ähnlichen Bereich. Abbildung 109 zeigt die adsorbierte Masse von TRITC-BSA dividiert durch die Masse

der sich im Reaktionsansatz befindenden Partikel bei einem pH-Wert von 2 in Abhängigkeit vom TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis. Es zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis und der TRITC-BSA-Adsorption. Mit steigendem TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis erhöht sich die adsorbierte Masse des Farbstoffs.

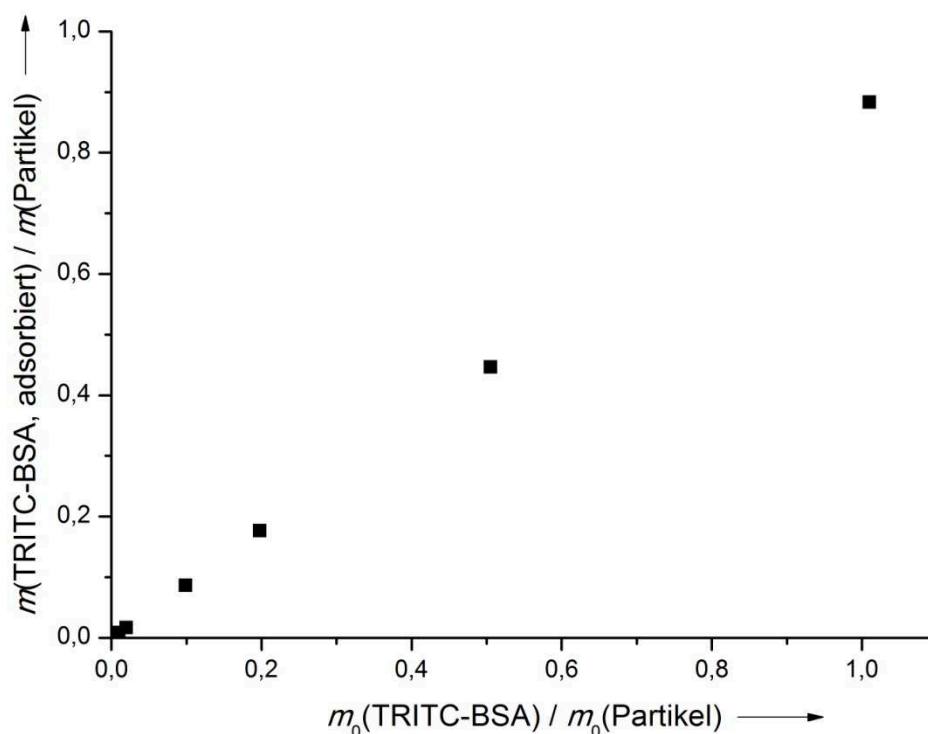


Abbildung 109: Adsorbierte Masse von TRITC-BSA dividiert durch die Masse der sich im Reaktionsansatz befindenden Partikel bei einem pH-Wert von 2 in Abhängigkeit vom TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

6.5.6. Adsorption von TRITC-BSA bei einem pH-Wert von 7

Zum Vergleich wurde das Adsorptionsverhalten von TRITC-BSA bei einem pH-Wert von 7 untersucht. Abbildung 110 zeigt die adsorbierte Masse von TRITC-BSA in Prozent bei einem pH-Wert von 7 in Abhängigkeit vom TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis. Für die Adsorption von TRITC-BSA zeigen sich Werte zwischen ca. 3 % und 20 % der ursprünglich im Reaktionsansatz vorhandenen Masse, dabei liegen die Werte bei allen TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnissen in einem ähnlichen Bereich. Nur wenige Ausreißer lassen sich erkennen. Besonders auffällig

ist, dass sich die prozentuale Adsorption von TRITC-BSA gegenüber den Werten bei einem pH-Wert von 2 drastisch verringert hat.

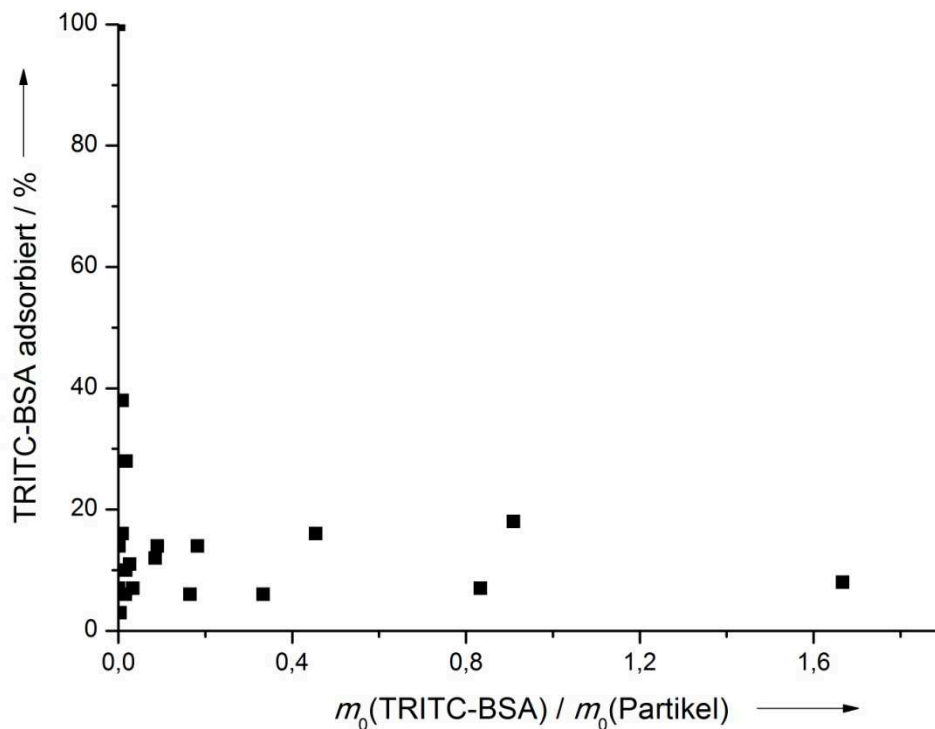


Abbildung 110: Adsorbierte Masse von TRITC-BSA in Prozent bei einem pH-Wert von 7 in Abhängigkeit vom TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

Abbildung 111 zeigt die adsorbierte Masse von TRITC-BSA dividiert durch die Masse der sich im Reaktionsansatz befindenden Partikel bei einem pH-Wert von 7 in Abhängigkeit vom TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis. Es zeigt sich ein grober linearer Zusammenhang zwischen dem TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis und der TRITC-BSA-Adsorption. Mit steigendem TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis erhöht sich die adsorbierte Masse des Proteins. Tendenziell ist die Adsorption von TRITC-BSA bei einem pH-Wert von 2 gegenüber der Adsorption bei einem pH-Wert von 7 deutlich erhöht. Die Experimente bestätigen die Vermutung, dass bei einem pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes die Adsorption aufgrund der gegensätzlichen Ladung stärker ausfallen sollte. Dies zeigt sich sowohl für FITC-BSA als auch für TRITC-BSA.

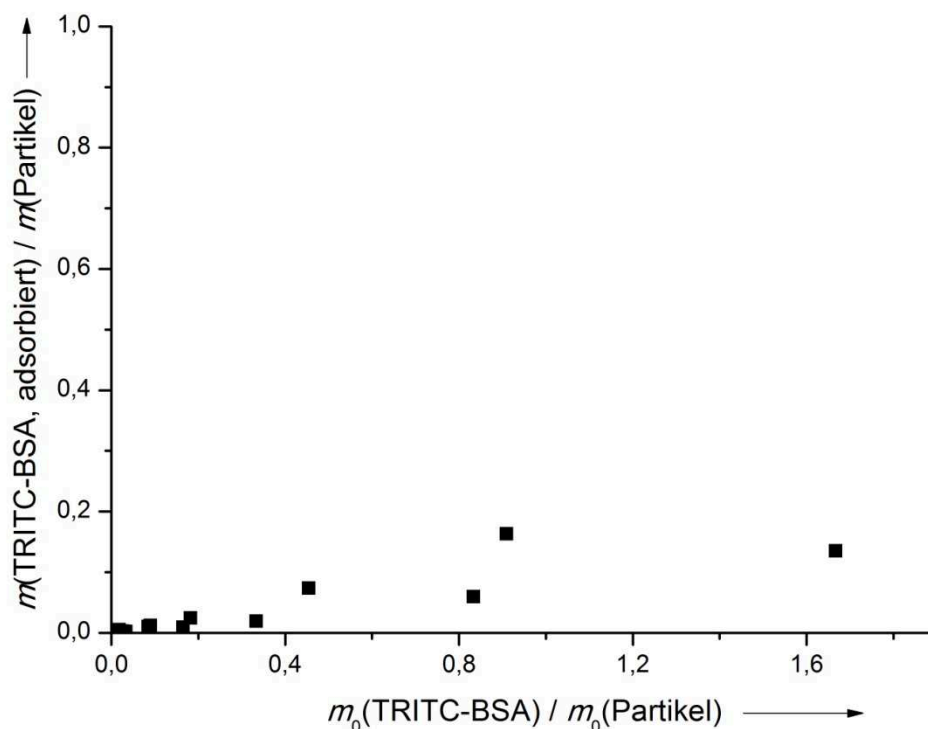


Abbildung 111: Adsorbierte Masse von TRITC-BSA dividiert durch die Masse der sich im Reaktionsansatz befindenden Partikel bei einem pH-Wert von 7 in Abhängigkeit vom TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

6.6. Bedeckungsgrad der funktionalisierten Nanopartikel

In diesem Abschnitt wird die Adsorption von FITC-BSA und TRITC-BSA durch den Bedeckungsgrad der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel quantitativ beschrieben. Der Bedeckungsgrad ist das Verhältnis von der Anzahl der besetzten Adsorptionsstellen zu der Anzahl der insgesamt vorhandenen Adsorptionsstellen bzw. das Verhältnis aus der adsorbierten Masse pro Partikel zu der Masse einer Monolage des Adsorbats. Über die Größe der Nanopartikel wurde die Oberfläche eines Partikels ausgerechnet ($1,02 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2$), hieraus wurde anschließend der Platzbedarf eines BSA-Moleküls auf der Partikeloberfläche berechnet. Für humanes Serumalbumin wird eine triangulare Prismenstruktur angenommen. Hierbei weisen die Seiten des gleichseitigen Dreiecks eine Länge von ungefähr 8 nm auf. Die Dicke des Proteins liegt bei ungefähr 3 nm.^[130] Aus diesen Daten kann die Dreiecksfläche des Proteins berechnet werden, die $2,77 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2$ beträgt. Da sich humanes Serumalbumin und bovines Serumalbumin sehr ähneln, können die Größenangaben für bovines Serumalbumin übernommen werden. Wenn das Protein mit dieser Fläche

auf einem funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel adsorbiert, so spricht man von einem *side-on*-Mechanismus. Generell können theoretisch zwei Adsorptionsmöglichkeiten für BSA in Betracht gezogen werden, der *side-on*-Mechanismus und der *edge-on*-Mechanismus.^[125] Beim *edge-on*-Mechanismus adsorbiert das Protein mit seiner rechteckigen Stirnfläche auf der Oberfläche des Partikels. Dividiert man die Partikeloberfläche durch die Dreiecksfläche des BSA, so erhält man theoretisch bei einer *end-on*-Adsorption die Anzahl an Adsorptionsstellen auf einem Partikel, die bei 36,7 BSA-Molekülen liegt. Aus der molaren Masse des Proteins (67000 g mol^{-1}) und der Konstante nach Avogadro ($6,02214129 \cdot 10^{23}$) wurde die Masse eines einzelnen BSA-Moleküls bestimmt, die $1,11 \cdot 10^{-22} \text{ kg}$ beträgt. Hieraus folgt die Masse einer Monolage auf einem Partikel mit $4,09 \cdot 10^{-21} \text{ kg}$. Durch die Division der absoluten, adsorbierten Proteinmasse durch die Partikelanzahl im jeweiligen Reaktionsansatz wurde die Masse an Adsorbat pro Partikel berechnet. Der Bedeckungsgrad wurde schließlich als Quotient der adsorbierten Masse und der Masse einer vollständigen Monolage erhalten.

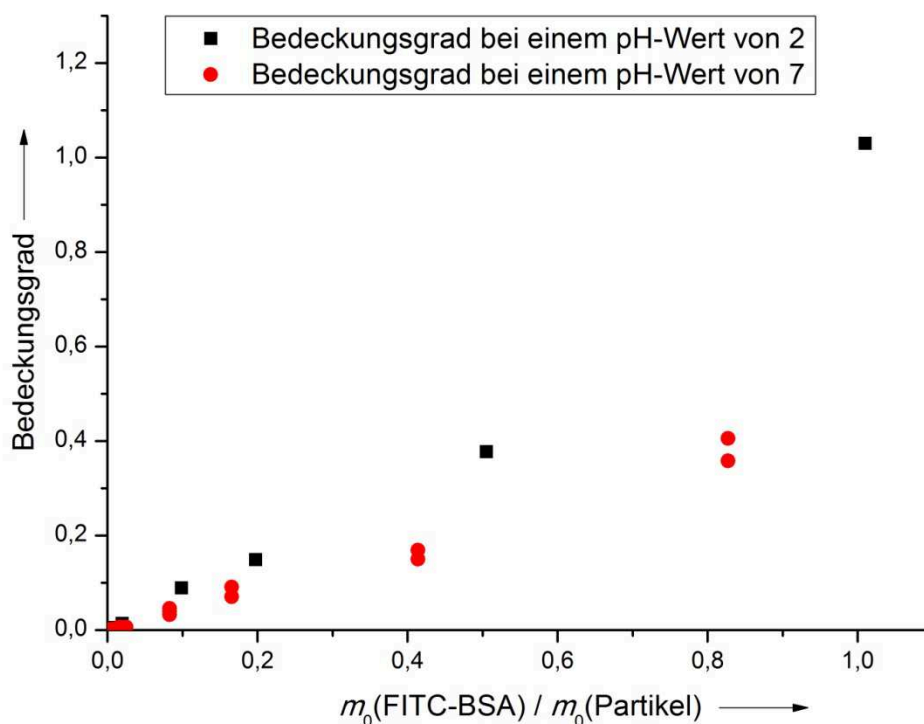


Abbildung 112: Bedeckungsgrad der mit FITC-BSA inkubierten, funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel bei zwei unterschiedlichen pH-Werten in Abhängigkeit vom FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

Abbildung 112 zeigt den Bedeckungsgrad der mit FITC-BSA inkubierten, funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel bei zwei unterschiedlichen pH-Werten in Abhängigkeit vom FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis. Bei der Berechnung wurde eine etwaige Änderung der Tertiärstruktur infolge der Proteinadsorption vernachlässigt. Man erkennt, dass mit steigendem FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis der Bedeckungsgrad für beide pH-Werte ansteigt. Die Adsorption ist bei einem pH-Wert von 2 gegenüber der Adsorption bei einem pH-Wert von 7 erhöht. Da BSA in diesem Fall unterhalb des isoelektrischen Punktes vorliegt und damit eine positive Nettoladung trägt, entspricht dies der Erwartung. Bis auf einen Messpunkt wird jedoch keine Monolage im untersuchten Bereich der FITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnisse auf der Partikeloberfläche ausgebildet.

Zum Vergleich zeigt Abbildung 113 den Bedeckungsgrad der mit TRITC-BSA inkubierten, funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel bei zwei unterschiedlichen pH-Werten in Abhängigkeit vom TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

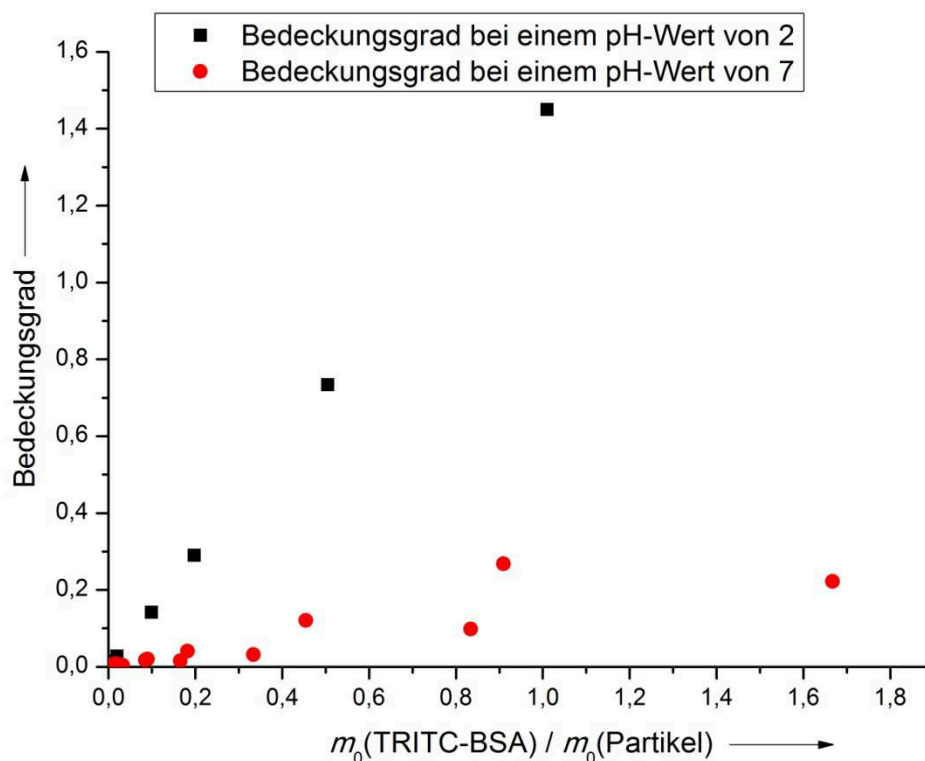


Abbildung 113: Bedeckungsgrad der mit TRITC-BSA inkubierten, funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel bei zwei unterschiedlichen pH-Werten in Abhängigkeit des TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis.

Auch im Fall des TRITC-BSA erkennt man, dass mit steigendem TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis der Bedeckungsgrad für beide pH-Werte ansteigt. Die Adsorption ist bei einem pH-Wert von 2 gegenüber der Adsorption bei einem pH-Wert von 7 ebenfalls erhöht. Während die Messpunkte bei einem pH-Wert von 7 sowohl bei FITC-BSA als auch bei TRITC-BSA ähnliche Bedeckungsgrade aufweisen, unterscheidet sich das Verhalten im sauren Bereich. Im Fall des TRITC-BSA zeigen sich ab einem TRITC-BSA-zu-Partikel-Massen-Verhältnis von 0,3 höhere Bedeckungsgrade als beim FITC-BSA. Dieser Befund kann nicht abschließend erklärt werden, da es sich bei der Proteinadsorption grundsätzlich um ein sehr komplexes Geschehen handelt. Da sich FITC- und TRITC-BSA nur in ihrer fluoreszierenden Gruppe unterscheiden, sollte eigentlich ein ähnliches Adsorptionsverhalten erwartet werden. In diesem Zusammenhang ist allerdings zu beachten, dass die FITC-Gruppe wesentlich empfindlicher auf den pH-Wert reagiert und somit eher zu einer Beeinflussung der gemessenen Werte beiträgt. Die Ergebnisse zeigen insgesamt den Einfluss des Protein-zu-Partikel-Massen-Verhältnisses auf das Ausmaß der Adsorption. Bei den Betrachtungen wird allerdings immer der Idealzustand eines frei dispergierten Partikels angenommen. Die Wechselwirkung des Proteins mit den funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikeln führt aber teilweise auch zu agglomerierten Partikelsystemen. Somit kann eine quantitative Beschreibung der Adsorption eines Systems immer nur für theoretische, ideale Bedingungen gelten. Würde man das System beispielsweise durch weitere Komponenten wie Elektrolyte, Proteine und Kohlenhydrate erweitern, um ein biologisches Umfeld zu simulieren, so würde die Agglomeration der Partikel wahrscheinlich stark zunehmen, so dass das Adsorptionsverhalten eher durch agglomerierte Partikel als durch frei dispergierte Teilchen geprägt wäre. Dies ist ein wichtiger Aspekt bei der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Proteinen und Nanopartikeln im biologischen Kontext.

6.7. Zusammenfassung und Diskussion der Adsorptionsexperimente

Es wurde die Wechselwirkung der funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel mit dem kationischen Molekül Methylenblau (MB), mit Fluoresceinisothiocyanat markiertem bovinem Serumalbumin (FITC-BSA) und mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat markiertem bovinem Serumalbumin (TRITC-BSA)

untersucht. Durch die Quantifizierung der adsorbierten Massen mittels UV-Vis-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Adsorption in den untersuchten Reaktionsansätzen vom Adsorptiv-zu-Partikel-Massen-Verhältnis abhängig war. Mit steigendem Adsorptiv-zu-Partikel-Massen-Verhältnis erhöhte sich auch das Ausmaß der Adsorption auf der Partikeloberfläche. Im Fall von FITC- und TRITC-BSA war die Adsorption bei einem pH-Wert von 2 höher als bei einem pH-Wert von 7, da BSA hier unterhalb des isoelektrischen Punktes vorliegt und eine positive Nettoladung aufweist. Da die funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikel aufgrund der Sulfonsäuregruppen auf der Partikeloberfläche selbst negativ geladen sind, sollte die Adsorption erwartungsgemäß auch stärker ausfallen. Ab einem Adsorptiv-zu-Partikel-Massen-Verhältnis von ca. 1,0 konnte die Bildung einer Monolage beobachtet werden. Bei einem pH-Wert von 7 wurden im Fall von FITC- und TRITC-BSA über den gesamten untersuchten Bereich keine Monolagen auf der Partikeloberfläche ausgebildet, bei der Adsorption des Proteins auf der Partikeloberfläche wurde im untersuchten Bereich wesentlich weniger als die Hälfte der Partikeloberfläche besetzt. Im Bereich der untersuchten Adsorptiv-zu-Partikel-Massen-Verhältnisse konnte bei allen Adsorptiven während der Adsorptionsexperimente kein Sättigungseffekt beobachtet werden. Um einen Sättigungseffekt zu ermitteln, müssten weitere Experimente mit höheren Adsorptiv-zu-Partikel-Massen-Verhältnissen durchgeführt werden. Bei kleinen Adsorptiv-zu-Partikel-Massen-Verhältnissen überwiegt die Oberfläche des Systems gegenüber dem freien Protein, so dass auch hier keine Monolage ausgebildet werden kann. Mit steigendem Adsorptiv-zu-Partikel-Massen-Verhältnis steht dann immer mehr Protein pro Partikel zur Verfügung, wodurch sich das Ausmaß der Adsorption erhöht. Im Fokus stand bei den Untersuchungen insbesondere die Abhängigkeit der Adsorption vom pH-Wert, es konnte ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten beobachtet werden.

Grundsätzlich gibt es eine Vielzahl von Faktoren, die einen Einfluss auf die Adsorption ausüben können. Welche Einflüsse hierbei dominieren, bleibt bis heute oft ungeklärt. Ein Problem könnte auch die Zentrifugation der Partikel darstellen, da schwach gebundene Proteine desorbiert werden könnten. Wenn die Wechselwirkung zwischen Proteinen und Nanopartikeln untersucht wird, ist gerade das Verhältnis zwischen Protein und Nanopartikeloberfläche von entscheidender Bedeutung für die Interaktion. MAHMOUDI *et al.* haben beispielsweise die Wechselwirkung von

Eisenoxid-Nanopartikeln (SPIONs) mit dem Protein Transferrin bei unterschiedlichen Protein-zu-Nanopartikeloberflächen-Verhältnissen untersucht.^[269] Mittels CD-Spektroskopie wurde die Konformation des Proteins im Kontakt mit den Nanopartikeln untersucht. Dabei lag offensichtlich eine schwächere Bindung des Transferrins zur Nanopartikeloberfläche bei höheren Protein-zu-Nanopartikeloberflächen-Verhältnissen vor. Hierbei spielt das Verhältnis von der Oberflächenenergie der Nanopartikel zu der Anzahl von Proteinen eine Rolle. Das Verhältnis zwischen Protein und Nanopartikeloberfläche kann somit die Adsorption und Bindungsaffinität entscheidend beeinflussen.

Der Einfluss der Oberflächenmodifizierung auf das Adsorptionsverhalten von BSA, Lysozym und Trypsin an kolloidalen Aluminiumoxidpartikeln wurden von MEDER *et al.* untersucht.^[144] Hierbei wurde die Partikeloberfläche entweder mit NH_2 -, COOH -, SO_3H - oder PO_3H_2 -Gruppen funktionalisiert. Es konnte ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten beobachtet werden. Für das Adsorptionsverhalten spielt demnach die Oberflächenfunktionalisierung und deren Acidität eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung zwischen Protein und Oberfläche. Die gezielte Oberflächenfunktionalisierung bietet somit ein gewisses Potential, die Wechselwirkung zu kontrollieren. In einer weiteren Arbeit konnte von MEDER *et al.* gezeigt werden, dass die Dichte von oberflächengebundenen Sulfonat-Gruppen auf kolloidalen Aluminiumoxidpartikeln einen entscheidenden Einfluss auf die Adsorption von BSA, Lysozym und Trypsin hat.^[145] Die Partikel hatten eine Oberflächendichte von 0 bis 4,7 Sulfonat-Gruppen pro Quadratnanometer. Mit steigender Dichte der Sulfonatgruppen nahm die adsorbierte Menge an BSA ab. Die Untersuchungen wurden bei einem pH-Wert von 6,9 durchgeführt. Neben der Art der Oberflächenfunktionalisierung spielt demnach auch die Dichte der funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche eine entscheidende Rolle bei der Adsorption. Der Einfluss des pH-Werts und der Temperatur auf die Adsorption von BSA auf Titandioxid wurde von KOPAC *et al.* beschrieben.^[270] Es wurde gezeigt, dass die Adsorption umso größer war, je niedriger der pH-Wert und je höher die Temperatur war. Die Wechselwirkung zwischen Protein und Partikeloberfläche beeinflusst auch die Konformation des Proteins, wie von ROACH *et al.* gezeigt wurde.^[110] Demnach stabilisieren Silica-Partikel mit einer hohen Oberflächenkrümmung (also kleinere Partikel) die native Konformation des bovinen Serumalbumins bei der Adsorption besser als größere Partikel, allerdings spielt auch die Hydrophilie hierbei eine Rolle.

PAN *et al.* haben Untersuchungen zu adsorptionsinduzierten Konformationsänderungen am Beispiel von 80 nm großen Latexpartikeln und dem Protein GB1 durchgeführt.^[112] Demnach ist es allerdings noch immer schwierig zu sagen, welche Regionen des Proteins genau adsorbieren und für die Denaturation verantwortlich sind. Am Beispiel von Silica-Nanopartikeln wurde die selektive Bindung von Peptiden an der Oberfläche von PATWARDHAN *et al.* untersucht.^[124] Hierbei standen die Wechselwirkungen der Peptide an der Silicaoberfläche und die Oberflächenchemie im Fokus, je nach Ionisierungszustand der Silicaoberfläche ändert sich die Affinität für entsprechend positiv oder negativ geladene Peptide. Von PUDDU *et al.* wurde ebenfalls die Wechselwirkung von Silica-Nanopartikeln mit Peptiden erforscht.^[123] Hierbei standen insbesondere die Bindungsmechanismen an der Partikeloberfläche im Fokus, es konnte auch ein Einfluss des pH-Werts auf das Bindungsverhalten festgestellt werden. Die Adsorption von bovinem Serumalbumin auf kolloidalen Aluminiumoxid-Partikeln wurde von REZWAN *et al.* untersucht, sie wurde mithilfe von Zetapotential- und UV-Vis-Messungen betrachtet.^[115] Anhand von weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Art der Partikel einen großen Einfluss auf das Adsorptionsverhalten von BSA hat, so war die adsorbierte Menge auf ZrO_2 -Partikeln wesentlich höher als auf SiO_2 -Partikeln.^[118] Die unterschiedliche Hydrophilie der Oberfläche wurde dafür verantwortlich gemacht. Im Fall der ZrO_2 -Partikel wurden stärkere hydrophobe Wechselwirkungen angenommen. An der hydrophilen Silicaoberfläche dominieren demnach eher die elektrostatischen Wechselwirkungen bei der BSA-Adsorption. Von SONG *et al.* wurden Adsorptionsexperimente mit BSA an TiO_2 -, SiO_2 - und Al_2O_3 -Partikeln durchgeführt, die Ergebnisse wurden mit der Adsorption an *bulk*-Partikeln verglichen.^[120] Neben der Untersuchung der für die Adsorption verantwortlichen Faktoren wurden auch Änderungen in der Konformation des adsorbierten Proteins beobachtet. Dabei scheint die Adsorption von BSA an Silica-Nanopartikeln überwiegend irreversibel zu sein, wie von TURCI *et al.* gezeigt wurde.^[129] In dem Zusammenhang wird aber auch erwähnt, dass Proteine auch in interpartikulären Poren adsorbieren könnten und somit von vorneherein weniger reversibel gebunden wären.

7. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Forschungsgebiete untersucht. Der erste Teil der Arbeit ist im materialwissenschaftlichen Bereich angesiedelt und behandelte die Entwicklung und Charakterisierung innovativer, degradierbarer Polymer-Keramik-Komposite als Knochenersatzmaterialien. Der zweite Teil der Arbeit ist dem Bereich der Grenzflächen- und Kolloidchemie zuzuordnen. Dort stand die Wechselwirkung von funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikeln mit dem kationischen Molekül Methyleneblau und dem Protein BSA im Fokus. Die Thematik der Grenzflächenchemie war der Verbindungspunkt beider Bereiche.

Das Ziel im ersten Teil der Arbeit bestand in der Untersuchung eines biokompatiblen Kompositmaterials als Knochenersatz. Dieses Material, bestehend aus Poly-(D,L-Lactid) und Calcit, unterschied sich durch ein mechanisches Compoundierungsverfahren des Herstellers und der sphärischen Morphologie der Calcit-Partikel deutlich von den zuvor in der Arbeitsgruppe von Prof. Matthias Epple untersuchten und etablierten Kompositmaterialien. Die Zusammensetzung des Materials hatte das etablierte Kompositmaterial mit den bekannten Eigenschaften als Vorbild. Durch den geänderten Herstellungsprozess konnten seitens des Herstellers organische Lösemittel aus der Verfahrenskette entfernt werden. Es wurden Kompositmaterialien mit unterschiedlichen Calcitgehalten geliefert und entsprechend untersucht. Ziel des gesamten Projektes war die Entwicklung osteogen wirksamer, resorbierbarer Implantate zur knöchernen Rekonstruktion im Bereich des Gesichtsschädels. In der vorliegenden Arbeit wurden die Kompositmaterialien bzgl. ihrer Eignung als Knochenersatzmaterial untersucht und mit dem etablierten Kompositmaterial verglichen. Hierbei standen insbesondere der Einfluss des lösemittelfreien Herstellungsverfahrens sowie die sphärische Morphologie der Calcitpartikel auf die Eigenschaften des Biomaterials im Mittelpunkt der Betrachtung. Die polymeren Kompositmaterialien wurden durch Begasung in PTFE-Hohlformen mit überkritischem Kohlenstoffdioxid zu porösen Formkörpern aufgeschäumt. Die so erhaltenen Formkörper wurden *in vitro* auf ihr Degradationsverhalten hin untersucht. Des Weiteren wurden die mechanischen Eigenschaften durch etablierte Prüfverfahren erfasst und in Abhängigkeit der Degradation dargestellt. Auch wurde die Übertragbarkeit des Begasungsverfahrens auf größere Probekörper für eine potentielle industrielle Nutzung geprüft. Ein weiterer Untersuchungsansatz bestand in der Generierung höherer Porositätsgrade im geschäumten Kompositmaterial sowie

der Ermittlung des Einflusses veränderter Schäumungsbedingungen auf Morphologie und Porosität der Formkörper. Die kontrollierte *in vitro*-Wirkstofffreisetzung des Antibiotikums Gentamycin als Modellschubstanz aus dem geschäumten Kompositmaterial sowie die mechanischen Kenngrößen des wirkstoffbeladenen Komposits wurden in einem weiteren Schritt ermittelt. Die generelle Eignung der mechanisch compoundingierten Kompositmaterialien als Knochenersatz konnte im Rahmen der Untersuchungen bestätigt werden. Der Vorteil dieser Komposite lag in dem lösemittelfreien Herstellungsprozess, der für eine spätere Zulassung eines medizinischen Produktes unabdingbar ist. Weitere Untersuchungen zur technischen Realisierung individueller Implantate und die Übertragung in eine industrielle Verfahrenskette sollten angestrebt werden. Darüber hinaus sollte das *in vivo*-Verhalten der Kompositmaterialien im Tierversuch getestet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wechselwirkung von funktionalisierten Siliciumdioxid-Nanopartikeln mit dem kationischen Molekül Methylenblau (MB), mit Fluoresceinisothiocyanat markiertem bovinem Serumalbumin (FITC-BSA) und mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat markiertem bovinem Serumalbumin (TRITC-BSA) untersucht. Das Ziel bestand darin, einen Beitrag zur Beantwortung der Frage nach dem Einfluss von Oberflächenmodifizierungen auf die Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und Proteinen zu leisten. Die gemachten Untersuchungen standen im Kontext einer sich um Nanopartikel im Kontakt mit biologischen Systemen bildenden Proteinkorona. Die Art und Charakteristik der Partikeloberfläche ist für die Wechselwirkung mit Proteinen der entscheidende Schritt. Zu Beginn erfolgte die vollständige Charakterisierung der Siliciumdioxid-Nanopartikel in ihrer reinen Form sowie in ihrer funktionalisierten Form. Mittels UV-Vis Spektroskopie konnte das Ausmaß der Adsorption bei zwei unterschiedlichen pH-Werten studiert werden. Von besonderem Interesse war hierbei das Adsorptionsverhalten auf der funktionalisierten Silicaoberfläche in Abhängigkeit des Protein-zu-Partikel-Massen-Verhältnisses. Insgesamt konnte eine Abhängigkeit des Adsorptionsverhaltens bei allen drei Adsorptiven vom pH-Wert sowie vom Adsorptiv-zu-Partikel-Massen-Verhältnis festgestellt werden, wenn auch der Einfluss des pH-Wertes beim BSA größer war. Mit steigendem Adsorptiv-zu-Partikel-Massen-Verhältnis konnte eine Erhöhung des Ausmaßes der Adsorption auf der Partikeloberfläche beobachtet werden. Grundsätzlich gibt es eine Vielzahl von Faktoren, die einen Einfluss auf das Adsorptionsverhalten ausüben können, insbesondere bei komplexen biologischen

Systemen. So ist die Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und Proteinen bis heute noch nicht vollständig im Detail verstanden, insbesondere erschwert die Vielzahl von Variablen in einem System die exakte Erfassung der zugrunde liegenden Vorgänge. Viele einzelne Aspekte sind bereits erforscht worden und ergänzen somit das Verständnis der komplexen Zusammenhänge. Weitere Untersuchungen zum Interaktionsverhalten zwischen Biomolekülen und funktionalisierten Nanopartikeln sind nötig, da die Verbreitung und Anwendung von nanopartikulären Materialien sprunghaft zunimmt. Gerade im medizinischen Kontext muss der Proteinkorona erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt werden, da sie dem partikulären System ihren Charakter verleiht, wie bis dato in der Literatur festgestellt wurde. Die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen ist für eine potentielle und gezielte Nutzung bzw. Steuerung der Adsorption unabdingbar. Viele der in biologischen Systemen adsorbierten Proteine können bei der Adsorption auf nanopartikulären Oberflächen ihre Konformation verändern, auch hier stellt sich die Frage, welche Konsequenzen sich daraus für das biologische System ergeben.

So möchte ich die Arbeit zum Schluss mit den Worten von WOLFGANG PAULI beenden: „Das Volumen des Festkörpers wurde von Gott geschaffen, seine Oberfläche aber wurde vom Teufel gemacht.“

8. Literaturverzeichnis

- [1] S. Weiner, H. D. Wagner, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, 28, 271.
- [2] M. Epple, M. Wehmöller, H. Eufinger, *Nova Acta Leopoldina NF 94* **2007**, 348, 39.
- [3] L. C. U. Junqueira, J. Carneiro, M. Gratzl, *Histologie*, Springer-Verlag, Heidelberg, **2004**.
- [4] E. Wintermantel, J. Mayer, K. Ruffieux, A. Bruinink, K. L. Eckert, *Der Chirurg* **1999**, 70, 847.
- [5] J. M. Rueger, *Orthopäde* **1998**, 2, 72.
- [6] M. Schieker, C. Heiss, W. Mutschler, *Unfallchirurg* **2008**, 8, 613.
- [7] C. Rentsch, B. Rentsch, D. Scharnweber, H. Zwipp, S. Rammelt, *Unfallchirurg* **2012**, 10, 938.
- [8] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3130.
- [9] S. Heinemann, M. Gelinsky, H. Worch, T. Hanke, *Orthopäde* **2011**, 40, 761.
- [10] M. Bohner, *Injury* **2000**, 31 Suppl. 4, D37.
- [11] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, J. A. Planell, *J. Royal Soc. Interface* **2008**, 5, 1137.
- [12] M. Vallet-Regi, J. M. González-Calbet, *Progr. Solid State Chem.* **2004**, 32, 1.
- [13] M. Bohner, *Mater. Today* **2010**, 13, 24.
- [14] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, R. L. Reis, *Macromol. Biosci.* **2004**, 4, 743.
- [15] T. A. Schildhauer, C. J. E. Gekle, G. Muhr, *Chirurg* **1999**, 70, 888.
- [16] S. K. Nandi, P. Mukherjee, S. Roy, B. Kundu, D. K. De, D. Basu, *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* **2009**, 29, 2478.
- [17] M. Vallet-Regi, F. Balas, M. Colilla, M. Manzano, *Solid State Sci.* **2007**, 9, 768.
- [18] C. H. D. Chen, C. C. Chen, M. Y. Shie, C. H. Huang, S. J. Ding, *Mater. Sci. Eng. C* **2011**, 31, 334.
- [19] H. van den Berghe, X. Garric, M. Vert, J. Coudane, *Polym. Int.* **2010**, 60, 398.
- [20] H. Gautier, J. Caillon, A. M. Le Ray, G. Daculsi, C. Merle, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 52, 308.
- [21] C. Strobel, G. Schmidmaier, B. Wildemann, *Int. J. Artif. Organs* **2011**, 34, 304.
- [22] V. Mouriño, A. R. Boccaccini, *J. R. Soc. Interface* **2010**, 7, 209.
- [23] H. Wahlig, W. Hameister, A. Grieben, *Langenbecks Arch. Chir.* **1972**, 331, 169.

- [24] M. A. Rauschmann, T. A. Wichelhaus, V. Stirnal, E. Dingeldein, L. Zichner, R. Schnettler, V. Alt, *Biomaterials* **2005**, 26, 2677.
- [25] J. G. E. Hendriks, D. Neut, J. R. van Horn, H. C. van der Mei, H. J. Busscher, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **2003**, 64B, 1.
- [26] M. Lucke, G. Schmidmaier, S. Sadoni, B. Wildemann, R. Schiller, N. P. Haas, M. Raschke, *Bone* **2003**, 32, 521.
- [27] K. I. Garvin, J. A. Miyano, D. Robinson, D. Giger, J. Novak, S. Radio, *J. Bone Joint Surg.* **1994**, 76-A, 1500.
- [28] D. Tadic, T. Welzel, P. Seidel, E. Wüst, E. Dingeldein, M. Epple, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2004**, 35, 1001.
- [29] J. S. Price, A. F. Tencer, D. M. Arm, G. A. Bohach, *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, 30, 281.
- [30] S. Vogt, K. D. Kühn, W. Ege, K. Pawlik, M. Schnabelrauch, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2003**, 34, 1041.
- [31] J. Österling, *Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen* **2010**.
- [32] K. Klemm, M. Börner, *Unfallchirurgie* **1986**, 12, 128.
- [33] N. H. Mast, D. Horwitz, *Oper. Tech. Orthop.* **2002**, 12, 232.
- [34] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation*, Teubner Verlag, Wiesbaden, **2003**.
- [35] C. Jacobs, A. Moghaddam, C. Wölfl, P. von der Linden, A. Wentzensen, G. Zimmermann, *Trauma Berufskr.* **2008**, 10 Suppl. 2, 226.
- [36] H. Schliephake, H. A. Weich, J. Schulz, R. Gruber, *J. Biomed. Mater. Res.* **2007**, 83A, 455.
- [37] Y. Hu, K. Cai, Z. Luo, R. Zhang, L. Yang, L. Deng, K. D. Jandt, *Biomaterials* **2009**, 30, 3626.
- [38] H. Kolk, C. Haczek, C. Koch, S. Vogt, M. Kullmer, C. Pautke, H. Deppe, C. Plank, *Biomaterials* **2011**, 32, 6850.
- [39] A. H. Reddi, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 247.
- [40] H. Schliephake, H. A. Weich, C. Dullin, R. Gruber, S. Frahse, *Biomaterials* **2008**, 29, 103.
- [41] G. Schmidmaier, B. Wildemann, H. Bail, M. Lucke, T. Fuchs, A. Stemberger, A. Flyvbjerg, N. P. Haas, M. Raschke, *Bone* **2001**, 28, 341.
- [42] D. Chen, M. Zhao, G. R. Mundy, *Growth Factors* **2004**, 22, 233.
- [43] T. Crouzier, K. Ren, C. Nicolas, C. Roy, C. Picart, *Small* **2009**, 5, 598.

- [44] A. Hoffmann, H. A. Weich, G. Gross, G. Hillmann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 57, 294.
- [45] A. H. Reddi, *Nat. Med.* **1997**, 3, 837.
- [46] N. Y. C. Yu, A. Schindeler, D. G. Little, A. J. Ruys, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **2010**, 93B, 285.
- [47] B. D. Ratner, *Polymer Science: A Comprehensive Reference* **2012**, 9, 397.
- [48] B. D. Ulery, L. S. Nair, C. T. Laurencin, *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.* **2011**, 49, 832.
- [49] A. Lendlein, *Chem. unserer Zeit* **1999**, 5, 279.
- [50] S. Singh, S. S. Ray, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, 7, 2596.
- [51] D. W. Hutmacher, *Biomaterials* **2000**, 21, 2529.
- [52] J. K. Oh, *Soft Matter* **2011**, 7, 5096.
- [53] H. Seyednejad, A. H. Ghassemi, C. F. van Nostrum, T. Vermonden, W. E. Hennink, *J. Control. Release* **2011**, 152, 168.
- [54] M. Kellomäki, H. Niiranen, K. W. Puumanen, N. Ashammakhi, T. P. Waris, P. Törmälä, *Biomaterials* **2000**, 21, 2495.
- [55] C. G. Ambrose, T. O. Clanton, *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, 32, 171.
- [56] E. S. Place, J. H. George, C. K. Williams, M. M. Stevens, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 1139.
- [57] C. Schiller, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum **2003**.
- [58] C. Schiller, M. Epple, *Biomaterials* **2003**, 24, 2037.
- [59] C. M. Agrawal, K. A. Athanasiou, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 38, 105.
- [60] C. Schiller, C. Rasche, M. Wehmöller, F. Beckmann, H. Eufinger, M. Epple, S. Weihe, *Biomaterials* **2004**, 25, 1239.
- [61] K. Gorna, M. Vučak, M. C. Hund, H.-D. Stöver, G. Wegner, *Kunststoffe* **2007**, 6.
- [62] *DIN EN ISO 178 Kunststoffe - Bestimmung der Biegeeigenschaften*
- [63] M. H. Sheridan, L. D. Shea, M. C. Peters, D. J. Mooney, *J. Control. Release* **2000**, 64, 91.
- [64] M. S. Watson, M. J. Whitaker, S. M. Howdle, K. M. Shakesheff, *Adv. Mater.* **2002**, 14, 1802.
- [65] A. Salerno, S. Iannace, P. A. Netti, *Macromol. Biosci.* **2008**, 8, 655.
- [66] S. Weihe, C. Rasche, C. Schiller, M. Wehmöller, R. Böckmann, H. Eufinger, M. Epple, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2004**, 35, 224.

- [67] A. Tschakaloff, H. Schliephake, M. Dard, *Mund Kiefer GesichtsChir.* **2000**, 4 [Suppl2], 474.
- [68] J. M. Kanczler, J. Barry, P. Ginty, S. M. Howdle, K. M. Shakesheff, R. O. C. Oreffo, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2007**, 352, 135.
- [69] T. Fujiwara, T. Yamaoka, Y. Kimura, K. J. Wynne, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2370.
- [70] H. M. Woods, M. M. C. G. Silva, C. Nouvel, K. M. Shakesheff, S. M. Howdle, *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 1663.
- [71] T. Annen, Dissertation, Universität Duisburg-Essen **2009**.
- [72] S. Backhaus, T. Annen, M. Eppler, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2013**, 44, 107.
- [73] A. R. C. Duarte, J. F. Mano, R. L. Reis, *J. Bioact. Compat. Polym.* **2009**, 24, 385.
- [74] E. Kiran, *J. Supercrit. Fluids* **2010**, 54, 296.
- [75] E. Tayton, M. Purcell, A. Aarvold, J. O. Smith, S. Kalra, A. Briscoe, K. Shakesheff, S. M. Howdle, *Acta Biomater.* **2012**, 8, 1918.
- [76] S. Weihe, M. Wehmöller, A. Tschakaloff, R. von Oepen, C. Schiller, M. Eppler, H. Eufinger, *Mund Kiefer GesichtsChir.* **2001**, 5, 299.
- [77] X. Liu, P. X. Ma, *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, 32, 477.
- [78] A. I. Cooper, *J. Mater. Chem.* **2000**, 10, 207.
- [79] H. Tai, M. L. Mather, D. Howard, W. Wang, L. J. White, J. A. Crowe, S. P. Morgan, A. Chandra, D. J. Williams, S. M. Howdle, K. M. Shakesheff, *Eur. Cell. Mater.* **2007**, 14, 64.
- [80] A. I. Cooper, *Adv. Mater.* **2001**, 13, 1111.
- [81] X. Teng, J. Ren, S. Gu, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **2007**, 81B, 185.
- [82] H. Yu, H. W. Matthew, P. H. Wooley, S.-Y. Yang, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **2008**, 86B, 541.
- [83] H.-R. Lin, C.-J. Kuo, C. Y. Yang, S.-Y. Shaw, Y.-J. Wu, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* **2002**, 63, 271.
- [84] E. Chevalier, D. Chulia, C. Pouget, M. Viana, *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 1135.
- [85] A. M. Le Ray, H. Gautier, J.-M. Bouler, P. Weiss, C. Merle, *Ceram. Int.* **2010**, 36, 93.
- [86] L. Lu, Q. Zhang, D. Wootton, P. I. Lekes, J. Zhou, *Rapid Prototyping J.* **2010**, 16, 365.

- [87] S. Ghosh, J. C. Viana, R. L. Reis, J. F. Mano, *J. Mater. Sci.: Mater. Med* **2007**, 18, 185.
- [88] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 1402.
- [89] J. Park, J. Joo, S. G. Kwon, Y. Jang, T. Hyeon, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 4714.
- [90] D. H. Everett, *Grundzüge der Kolloidwissenschaft*, Steinkopff Verlag, Darmstadt, **1992**.
- [91] T. V. Duncan, *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, 363, 1.
- [92] R. Jin, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 6852.
- [93] P. Yang, A. Zhang, H. Sun, F. Liu, Q. Jiang, X. Cheng, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, 345, 222.
- [94] M. J. Ruedas-Rama, J. D. Walters, A. Orte, E. A. H. Hall, *Anal. Chim. Acta* **2012**, 751, 1.
- [95] V. Sokolova, M. Epple, *Nanoscale* **2011**, 3, 1957.
- [96] V. Sokolova, A. Kovtun, R. Heumann, M. Epple, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, 12, 174.
- [97] Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan, *New Engl. J. Med.* **2010**, 363, 2434.
- [98] S. K. Murthy, *Int. J. Nanomedicine* **2007**, 2, 129.
- [99] T. L. Doane, C. Burda, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2885.
- [100] W. J. Stark, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1242.
- [101] V. J. Mohanraj, Y. Chen, *Trop. J. Pharm. Res.* **2006**, 5, 561.
- [102] G. Maruthi, A. A. Smith, R. Manavalan, *J. Adv. Sci. Res.* **2011**, 2, 12.
- [103] D. Kozlova, S. Chernousova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 396.
- [104] R. Mout, D. F. Moyano, S. Rana, V. M. Rotello, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2539.
- [105] V. Sokolova, O. Rotan, J. Klesing, P. Nalbant, J. Buer, T. Knuschke, A. Westendorf, M. Epple, *J. Nanopart. Res.* **2012**, 14, 1.
- [106] L. Treuel, X. Jiang, U. Nienhaus, *J. R. Soc. Interface* **2013**, 10, 1.
- [107] V. Sokolova, D. Kozlova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Epple, *Acta Biomater.* **2013**, 9, 7527.
- [108] V. Mailänder, K. Landfester, *Biomacromolecules* **2009**, 10, 2379.
- [109] M. E. Davis, Z. Chen, D. M. Shin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7, 771.
- [110] P. Roach, D. Farrar, C. C. Perry, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3939.

- [111] L. Treuel, M. Malissek, J. S. Gebauer, R. Zellner, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 3093.
- [112] H. Pan, M. Qin, W. Meng, Y. Cao, W. Wang, *Langmuir* **2012**, *28*, 12779.
- [113] M. Lundqvist, I. Sethson, B.-H. Jonsson, *Langmuir* **2004**, *20*, 10639.
- [114] L. Treuel, M. Malissek, in *T Cellular and Subcellular Nanotechnology*, Vol. 991, **2013**, pp. 225.
- [115] K. Rezwan, L. P. Meier, M. Rezwan, J. Vörös, M. Textor, L. J. Gauckler, *Langmuir* **2004**, *20*, 10055.
- [116] A. Ravindran, A. Singh, A. M. Raichur, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee, *Colloids Surf., B* **2010**, *76*, 32.
- [117] K. Rezwan, L. P. Meier, L. J. Gauckler, *Biomaterials* **2005**, *26*, 4351.
- [118] K. Rezwan, A. R. Studart, J. Vörös, L. J. Gauckler, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14469.
- [119] C. E. Giacomelli, W. Norde, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *233*, 234.
- [120] L. Song, K. Yang, W. Jiang, P. Du, B. Xing, *Colloids Surf., B* **2012**, *94*, 341.
- [121] S. Fukuzaki, H. Urano, K. Nagata, *J. Ferment. Bioeng.* **1996**, *81*, 163.
- [122] A. A. Shemetov, I. Nabiev, A. Sukhanova, *ACS Nano* **2012**, *6*, 4585.
- [123] V. Puddu, C. C. Perry, *ACS Nano* **2012**, *6*, 6356.
- [124] S. V. Patwardhan, F. S. Emami, R. J. Berry, S. E. Jones, R. R. Naik, O. Deschaume, H. Heinz, C. C. Perry, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6244.
- [125] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *162*, 87.
- [126] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91*, 233.
- [127] S. Robinson, P. A. Williams, *Langmuir* **2002**, *18*, 8743.
- [128] M. Mahmoudi, I. Lynch, M. R. Ejtehadi, M. P. Monopoli, F. B. Bombelli, S. Laurent, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5610.
- [129] F. Turci, E. Ghibaudi, M. Colonna, B. Boscolo, I. Fenoglio, B. Fubini, *Langmuir* **2010**, *26*, 8336.
- [130] C. Rocker, M. Potzl, F. Zhang, W. J. Parak, G. U. Nienhaus, *Nat. Nano.* **2009**, *4*, 577.
- [131] A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543.
- [132] M. P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nat. Nano.* **2012**, *7*, 779.
- [133] C. D. Walkey, W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2780.
- [134] I. Lynch, K. A. Dawson, *Nano Today* **2008**, *3*, 40.

- [135] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggård, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, S. Linse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2050.
- [136] J. S. Gebauer, M. Malissek, S. Simon, S. K. Knauer, M. Maskos, R. H. Stauber, W. Peukert, L. Treuel, *Langmuir* **2012**, *28*, 9673.
- [137] D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5761.
- [138] M. P. Monopoli, F. B. Bombelli, K. A. Dawson, *Nat. Nano.* **2011**, *6*, 11.
- [139] M. P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. Baldelli Bombelli, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2525.
- [140] X.-R. Xia, N. A. Monteiro-Riviere, J. E. Riviere, *Nat. Nano.* **2010**, *5*, 671.
- [141] A. Lesniak, F. Fenaroli, M. P. Monopoli, C. Åberg, K. A. Dawson, A. Salvati, *ACS Nano* **2012**, *6*, 5845.
- [142] S. Tenzer, D. Docter, S. Rosfa, A. Wlodarski, J. Kuharev, A. Rekik, S. K. Knauer, C. Bantz, T. Nawroth, C. Bier, J. Sirirattanapan, W. Mann, L. Treuel, R. Zellner, M. Maskos, H. Schild, R. H. Stauber, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7155.
- [143] X. R. Xia, N. A. Monteiro-Riviere, S. Mathur, X. Song, L. Xiao, S. J. Oldenberg, B. Fadeel, J. E. Riviere, *ACS Nano* **2011**, *5*, 9074.
- [144] F. Meder, T. Daberkow, L. Treccani, M. Wilhelm, M. Schowalter, A. Rosenauer, L. Mädler, K. Rezwan, *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 1221.
- [145] F. Meder, C. Brandes, L. Treccani, K. Rezwan, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 5780.
- [146] R. Rodriguez, R. Herrera, A. B. Bourlinos, R. Li, A. Amassian, L. A. Archer, E. P. Giannelis, *Appl. Organomet. Chem.* **2010**, *24*, 581.
- [147] R. Rodriguez, R. Herrera, L. A. Archer, E. P. Giannelis, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4353.
- [148] A. B. Bourlinos, E. P. Giannelis, Q. Zhang, L. A. Archer, G. Floudas, G. Fytas, *Eur. Phys. J. E* **2006**, *20*, 109.
- [149] M. L. Jespersen, P. A. Mirau, E. v. Meerwall, R. A. Vaia, R. Rodriguez, E. P. Giannelis, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3735.
- [150] A. B. Bourlinos, R. Herrera, N. Chalkias, D. D. Jiang, Q. Zhang, L. A. Archer, E. P. Giannelis, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 234.
- [151] A. B. Bourlinos, S. Ray Chowdhury, R. Herrera, D. D. Jiang, Q. Zhang, L. A. Archer, E. P. Giannelis, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 1285.
- [152] G. A. Ozin, L. Cademartiri, *Small* **2011**, *7*, 49.
- [153] G. A. Ozin, L. Cademartiri, *Small* **2009**, *5*, 1240.

- [154] R. Behra, H. Krug, *Nat. Nano.* **2008**, 3, 253.
- [155] H. F. Krug, P. Wick, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 1294.
- [156] S. M. Hussain, L. K. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, R. C. Murdock, K. O. Yu, D. M. Mattie, J. J. Schlager, M. Terrones, *Adv. Mater.* **2009**, 21, 1549.
- [157] A. Schrand, L. Dai, J. Schlager, S. Hussain, in *New Technologies for Toxicity Testing*, Vol. 745, Springer US, **2012**, pp. 58.
- [158] D. Y. Lai, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2012**, 4, 1.
- [159] B. Jachimska, M. Wasilewska, Z. Adamczyk, *Langmuir* **2008**, 24, 6866.
- [160] A. Salis, M. Boström, L. Medda, F. Cugia, B. Barse, D. F. Parsons, B. W. Ninham, M. Monduzzi, *Langmuir* **2011**, 27, 11597.
- [161] D.-H. Tsai, F. W. DelRio, A. M. Keene, K. M. Tyner, R. I. MacCuspie, T. J. Cho, M. R. Zachariah, V. A. Hackley, *Langmuir* **2011**, 27, 2464.
- [162] C. Tanford, J. G. Buzzell, D. G. Rands, S. A. Swanson, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 6421.
- [163] E. Parfenyuk, G. Kulikova, I. Ryabinina, *J. Therm. Anal. Calorim.* **2010**, 100, 987.
- [164] A. Bujacz, *Acta Cryst.* **2012**, D68, 1278.
- [165] T. J. Peters, *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [166] K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor, *Mol. Immunol.* **2012**, 52, 174.
- [167] B. Jachimska, A. Pajor, *Bioelectrochemistry* **2012**, 87, 138.
- [168] C. Wischke, H. H. Borchert, *Pharmazie* **2006**, 61, 770.
- [169] H. Larsericsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 289, 26.
- [170] H. Lucas, B. Schneeweiß, W. P. Brunke, *Das Neue Grosse Gesundheitsbuch*, Bechtermünz - Zusammenarbeit zwischen Südwest Verlag, München und Verlag Das Beste, Stuttgart, **1999**.
- [171] P. Deetjen, E.-J. Speckmann, J. Hescheler, *Physiologie*, Elsevier, Urban & Fischer München, **2005**.
- [172] E. Wintermantel, S. W. Ha, *Medizintechnik-Life Science Engineering*, Springer-Verlag, **2008**.
- [173] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, M. J. Glimcher, *Osteoporos. Int.* **2009**, 20, 1013.

- [174] S. L. Teitelbaum, *Science* **2000**, 289, 1504.
- [175] D. F. Williams, *Biomaterials* **2009**, 30, 5897.
- [176] Y. Glass, P. Eickholz, G.-H. Nentwig, B. Dannewitz, *Paradontologie* **2008**, 19, 465.
- [177] P. Roach, D. Eglin, K. Rohde, C. Perry, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2007**, 18, 1263.
- [178] K. Anselme, *Osteoporosis Int.* **2011**, 22, 2037.
- [179] J. M. Raquez, R. Mincheva, O. Coulembier, P. Dubois, in *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Elsevier, Amsterdam, **2012**, pp. 761.
- [180] A. P. Gupta, V. Kumar, *Eur. Polym. J.* **2007**, 43, 4053.
- [181] A. J. R. Lasprilla, G. A. R. Martinez, B. H. Lunelli, A. L. Jardini, R. M. Filho, *Biotechnol. Adv.* **2012**, 30, 321.
- [182] N. Murthy, S. Wilson, J. C. Sy, in *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Elsevier, Amsterdam, **2012**, pp. 547.
- [183] M. E. Davis, *Nature* **2002**, 417, 813.
- [184] D. Tadic, F. Beckmann, K. Schwarz, M. Eppe, *Biomaterials* **2004**, 25, 3335.
- [185] G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, *Macromol. Biosci.* **2002**, 2, 67.
- [186] I. Uçkay, K. Jugun, A. Gamulin, J. Wagener, P. Hoffmeyer, D. Lew, *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2012**, 14, 566.
- [187] R. M. Sellei, P. Kobbe, M. Knobe, P. Lichte, T. Dienstknecht, S. W. Lemmen, H. C. Pape, *Orthopäde* **2012**, 41, 43.
- [188] D. P. Lew, F. A. Waldvogel, *New Engl. J. Med.* **1997**, 336, 999.
- [189] D. P. Lew, F. A. Waldvogel, *Lancet* **2004**, 364, 369.
- [190] R. A. Brady, J. G. Leid, J. W. Costerton, M. E. Shirtliff, *Clin. Microbiol. Newsletter* **2006**, 28, 65.
- [191] R. Haidar, A. D. Boghossian, B. Atiyeh, *Int. J. Infect. Diseases* **2010**, 14, e752.
- [192] B. Spellberg, B. A. Lipsky, *Clin. Infect. Dis.* **2012**, 54, 393.
- [193] B. Parsons, E. Strauss, *Am. J. Surg.* **2004**, 188, 57.
- [194] G. Mouzopoulos, N. K. Kanakaris, G. Kontakis, O. Obakponowwe, R. Townsend, P. V. Giannoudis, *Injury* **2011**, 42, S18.
- [195] V. Alt, T. Bechert, P. Steinrücke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, D. Scheddin, E. Domann, R. Schnettler, *Orthopäde* **2004**, 33, 885.
- [196] V. Alt, T. Bechert, P. Steinrücke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Domann, R. Schnettler, *Biomaterials* **2004**, 25, 4383.

- [197] X. Chen, H. J. Schluesener, *Toxicol. Lett.* **2008**, 176, 1.
- [198] K. Chaloupka, Y. Malam, A. M. Seifalian, *Trends Biotechnol.* **2010**, 28, 580.
- [199] N. B. Golovina, L. M. Kustov, *Mendeleev Commun.* **2013**, 23, 59.
- [200] M. C. Stensberg, Q. Wei, E. S. McLamore, D. M. Porterfield, A. Wei, M. S. Sepúlveda, *Nanomedicine* **2011**, 6, 879.
- [201] C. E. Albers, W. Hofstetter, K. A. Siebenrock, R. Landmann, F. M. Klenke, *Nanotoxicology* **2013**, 7, 30.
- [202] C. Levard, E. M. Hotze, G. V. Lowry, G. E. Brown, *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 46, 6900.
- [203] J. Liu, Z. Wang, F. D. Liu, A. B. Kane, R. H. Hurt, *ACS Nano* **2012**, 6, 9887.
- [204] F. Horn, I. Moc, N. Schneider, C. Grillhösl, S. Berghold, G. Lindenmeier, *Biochemie des Menschen*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [205] L. S. Gonzalez, J. P. Spencer, *Am. Fam. Physician.* **1998**, 15, 1811.
- [206] M. Fassbender, S. Minkwitz, Z. Kronbach, C. Strobel, A. Kadow-Romacker, G. Schmidmaier, B. Wildemann, *Bone* **2013**, 55, 298.
- [207] P. Balakumar, A. Rohilla, A. Thangathirupathi, *Pharmacol. Res.* **2010**, 62, 179.
- [208] S. S. Sampath, D. H. Robinson, *J. Pharm. Sci.* **1990**, 79, 428.
- [209] T. Hofmann, *Chem. Unserer Zeit* **2004**, 38, 24.
- [210] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [211] G. Jander, E. Blasius, *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, **1983**.
- [212] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer, Berlin, **2002**.
- [213] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, VCH, Weinheim, **1985**.
- [214] *Zetasizer Nano Series, Benutzerhandbuch*, Malvern Instruments, **2004**.
- [215] E. Riedel, C. Janiak, *Anorganische Chemie*, de Gruyter, Berlin, **2007**.
- [216] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, 26, 62.
- [217] I. A. M. Ibrahim, A. A. F. Zikry, M. A. Sharaf, *J. Am. Sci.* **2010**, 6, 985.
- [218] L. T. Zhuravlev, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2000**, 173, 1.
- [219] H. E. Bergna, W. O. Roberts, *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications*, CRC Press, Boca Raton, **2006**.

- [220] R. K. Iler, *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry* Wiley-Interscience, New York, **1979**.
- [221] *Silane Coupling Agents: Connecting Across Boundaries*, Broschüre, Gelest Inc., **2006**.
- [222] S. Minakata, M. Komatsu, *Chem. Rev.* **2008**, 109, 711.
- [223] L. Wang, W. Zhao, W. Tan, *Nano Res.* **2008**, 1, 99.
- [224] D. Knopp, D. Tang, R. Niessner, *Anal. Chim. Acta* **2009**, 647, 14.
- [225] W. Tan, K. Wang, X. He, X. J. Zhao, T. Drake, L. Wang, R. P. Bagwe, *Med. Res. Rev.* **2004**, 24, 621.
- [226] L. R. Hilliard, X. Zhao, W. Tan, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 470, 51.
- [227] M. Qhobosheane, S. Santra, P. Zhang, W. Tan, *Analyst* **2001**, 126, 1274.
- [228] J. L. Vivero-Escoto, R. C. Huxford-Phillips, W. Lin, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2673.
- [229] A. Burns, P. Sengupta, T. Zedayko, B. Baird, U. Wiesner, *Small* **2006**, 2, 723.
- [230] H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, U. Wiesner, *Nano Lett.* **2004**, 5, 113.
- [231] A. Van Blaaderen, A. Vrij, *Langmuir* **1992**, 8, 2921.
- [232] T. Y. Ohulchanskyy, I. Roy, L. N. Goswami, Y. Chen, E. J. Bergey, R. K. Pandey, A. R. Oseroff, P. N. Prasad, *Nano Lett.* **2007**, 7, 2835.
- [233] I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, D. J. Bharali, H. E. Pudavar, R. A. Mistretta, N. Kaur, P. N. Prasad, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 279.
- [234] C. Hom, J. Lu, F. Tamanoi, *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 6308.
- [235] Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2590.
- [236] J. M. Rosenholm, C. Sahlgren, M. Linden, *Nanoscale* **2010**, 2, 1870.
- [237] J. Lu, M. Liong, Z. Li, J. I. Zink, F. Tamanoi, *Small* **2010**, 6, 1794.
- [238] F. Torney, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, K. Wang, *Nat Nano* **2007**, 2, 295.
- [239] J. Duan, Y. Yu, Y. Li, Y. Yu, Z. Sun, *Biomaterials* **2013**, 34, 5853.
- [240] Y.-H. Park, H. Bae, Y. Jang, S. Jeong, H. Lee, W.-I. Ryu, M. Yoo, Y.-R. Kim, M.-K. Kim, J. Lee, J. Jeong, S. Son, *Mol. Cell. Toxicol.* **2013**, 9, 67.
- [241] D. Drescher, G. Orts-Gil, G. Laube, K. Natte, R. W. Veh, W. Österle, J. Kneipp, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, 1367.
- [242] C. Fede, F. Selvestrel, C. Compagnin, M. Mognato, F. Mancin, E. Reddi, L. Celotti, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 404, 1789.

- [243] D. Napierska, L. C. J. Thomassen, D. Lison, J. A. Martens, P. H. Hoet, *Part. Fibre Toxicol.* **2010**, 7:39, 1.
- [244] L. Vroman, A. L. Adams, G. C. Fischer, P. C. Munoz, *Blood* **1980**, 55, 156.
- [245] F. Darabi Sahneh, C. Scoglio, J. Riviere, *PLoS ONE* **2013**, 8: e64690, 1.
- [246] V. Mirshafiee, M. Mahmoudi, K. Lou, J. Cheng, M. L. Kraft, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 2557.
- [247] G. Schwedt, *Analytische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [248] M. H. Gey, *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*, Springer, Berlin ; Heidelberg, **2008**.
- [249] G. Widmann, R. Riesen, *Thermoanalyse: Anwendungen, Begriffe, Methoden*, Hüthig, Heidelberg, **1987**.
- [250] *Introduction to Differential Sedimentation*, CPS Instruments Europe, **2013**.
- [251] *CPS-Scheibenzentrifugen*, CPS Instruments Europe, **2013**.
- [252] M. Otto, *Analytische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [253] H. Kuchling, *Taschenbuch der Physik*, Harri Deutsch, Thun, Frankfurt/Main, **1982**.
- [254] N. C. Keramaris, G. M. Calori, V. S. Nikolaou, E. H. Schemitsch, P. V. Giannoudis, *Injury* **2008**, 39, Supplement 2, 45.
- [255] H. Eufinger, C. Rasche, J. Lehmbruck, M. Wehmöller, S. Weihe, I. Schmitz, C. Schiller, M. Eppe, *Biomaterials* **2007**, 28, 475.
- [256] C. Shasteen, Y. Choy, *Biomed. Eng. Lett.* **2011**, 1, 163.
- [257] H. Domininghaus, *Die Kunststoffe und ihre Eigenschaften*, Springer Berlin Heidelberg, **2005**.
- [258] J. F. Mano, J. L. Gómez Ribelles, N. M. Alves, M. Salmerón Sanchez, *Polymer* **2005**, 46, 8258.
- [259] S. Li, S. McCarthy, *Biomaterials* **1999**, 20, 35.
- [260] J. D. Currey, *Calcif. Tissue Int.* **2001**, 68, 205.
- [261] D. Tadic, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum **2003**.
- [262] K. Schwarz, M. Eppe, *Macromol. Rapid Comm.* **1998**, 19, 613.
- [263] K. Schwarz, Dissertation, Universität Hamburg **2001**.
- [264] R. Zhang, P. X. Ma, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 52, 430.
- [265] D. J. Mooney, D. F. Baldwin, N. P. Suh, J. P. Vacanti, R. Langer, *Biomaterials* **1996**, 17, 1417.

- [266] A. Salvati, A. S. Pitek, M. P. Monopoli, K. Prapainop, F. B. Bombelli, D. R. Hristov, P. M. Kelly, C. Aberg, E. Mahon, K. A. Dawson, *Nat. Nano.* **2013**, *8*, 137.
- [267] D. Mahl, J. Diendorf, W. Meyer-Zaika, M. Epple, *Colloids Surf., A* **2011**, *377*, 386.
- [268] C. Metin, L. Lake, C. Miranda, Q. Nguyen, *J. Nanopart. Res.* **2011**, *13*, 839.
- [269] M. Mahmoudi, M. A. Shokrgozar, S. Sardari, M. K. Moghadam, H. Vali, S. Laurent, P. Stroeve, *Nanoscale* **2011**, *3*, 1127.
- [270] T. Kopac, K. Bozgeyik, J. Yener, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2008**, *322*, 19.

9. Anhang

9.1. Abkürzungsverzeichnis

ACC	Amorphes Calciumcarbonat
ACP	amorphes Calciumphosphat
BMP	Knochenwachstumsfaktoren (engl. <i>bone morphogenetic protein</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
DCS	Analytische Scheibenzentrifugation (engl. <i>differential centrifugal sedimentation</i>)
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
DLS	Dynamische Lichtstreuung (engl. <i>dynamic light scattering</i>)
DLVO	Theorie von Derjagin, Landau, Verwey und Overbeek
EA	Elementaranalyse
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-BSA	Fluoresceinisothiocyanat-markiertes bovines Serumalbumin
HAP	Hydroxylapatit
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IR	Infrarot
KIP	Kaltisostatisches Pressen
MB	Methylenblau
NP	Nanopartikel
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline solution</i>)
PCC	<i>precipitated calcium carbonate</i>
PDI	Polydispersitätsindex
PDLLA	Poly-(<i>D,L</i> -Lactid)
PFA	Perfluor-Alkoxy-Polymere
PGA	Polyglycolid
PLGA	Poly-(<i>D,L</i> -Lactid-co-Glycolid)
PGLA	Poly-(Glycolid-co-Lactid)
PLLA	Poly-(<i>L</i> -Lactid)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen

PVA	Polyvinylalkohol
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur (im Mittel ca. 296 K)
TA	Thermische Analyse
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TRITC-BSA	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat-markiertes bovines Serumalbumin
UV	Ultraviolett
VE	Voll entsalzt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vis	sichtbar (engl. <i>visible</i>)

9.2. Publikationsliste

Referierte Publikationen

S. Backhaus, T. Annen, M. Eppe, "A porous pH-stabilized composite material consisting of poly(*D,L*-lactide), calcium carbonate and gentamicin for bone substitution", *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, **2013**, 44, 107-111.

Weitere Publikationen

N. Moser, J. Boven, S. Backhaus, T. Annen, M. Eppe, H. Schliephake, "Kombinierte retardierte Freisetzung von rhBMP2 und rhVEGF165 aus PDLLA/Kalziumcarbonat-Gerüsten. Untersuchungen zur *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität der Angiogenese und Osteogenese“, *BioNanoMaterials*, **2013**, 14, 59.

Poster und Vorträge (P = Poster, V = Vortrag)

23th European Symposium on Biomaterials (ESB 2010), 11.-15.09.2010, Tampere, Finnland, S. Backhaus, T. Annen, M. Eppe, "Mechanical characterization of a porous pH-stabilized composite material consisting of poly(*D,L*-lactide), calcium carbonate, and gentamicin" (P)

62. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie, Freiburg i. Br. 31.05.-02.06.2012, N. Moser, J. Boven, S. Backhaus, T. Annen, M. Eppe, H. Schliephake, "Einfluss der kombinierten Freisetzung von rhBMP2 und rhVEGF165 aus PDLLA/Kalziumcarbonat-Gerüsten auf die *in vitro*-Aktivität der Angiogenese und Osteogenese" (V)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Erlangen, 26.-28.09.2013, N. Moser, J. Bover, S. Backhaus, T. Annen, M. Eppe, H. Schliephake, "Kombinierte retardierte Freisetzung von rhBMP2 und rhVEGF165 aus PDLLA/Kalziumkarbonat-Gerüsten. Untersuchungen zur *in-vitro* und *in vivo*-Aktivität der Angiogenese und Osteogenese" (V)

9.3. Lebenslauf

Lebenslauf aus Datenschutzgründen nicht enthalten

Lebenslauf aus Datenschutzgründen nicht enthalten

9.4. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Polymer-Keramik-Kompositmaterialien als Knochenersatz und die Wechselwirkung von Nanopartikeln mit Biomolekülen“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, September 2013

Sven Backhaus

9.5. Danksagungen

Ich danke (ohne bestimmte Reihenfolge),

Herrn Prof. Dr. Matthias Epple herzlich für die Übergabe des interessanten und herausfordernden Themas und seine gute Betreuung und Unterstützung während der gesamten Promotionszeit sowie bei der Anfertigung dieser Arbeit. Besonders hervorheben möchte ich auch die Ermöglichung meiner internationalen Forschungsaufenthalte sowie die Beteiligung am anwendungsnahen BMBF-Projekt.

Herrn Prof. Dr. Christian Mayer für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. Thomas Annen für die Übergabe des Knochenersatz-Themas, die Einarbeitung in das Thema und die Zusammenarbeit bei der Projektarbeit.

Den Kooperationspartnern des BMBF-Projektes für die ausgezeichnete interdisziplinäre Zusammenarbeit: dem Unternehmen Karl Leibinger Medizintechnik GmbH & Co. KG, dem Unternehmen Schaefer Kalk GmbH & Co. KG, der Abteilung Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen und dem Unternehmen ReliaTech Receptor Ligand Technologies GmbH.

Frau Kerstin Brauner und Frau Veronika Hiltenkamp für die Ausführung der EA-Messungen.

Herrn Dr. Meyer-Zaika für die Anfertigung der TEM-Aufnahmen.

Herrn Smail Boukercha, Frau Kateryna Loza und Frau Ursula Giebel für die Anfertigung der REM-Aufnahmen.

Herrn Jürgen Gündel-Graber für die Anfertigung der XRD-Messungen.

Frau Carola Fischer für die Erstellung von technischen Konstruktionen, Teflonformen sowie diversen feinmechanischen Arbeiten.

Allen Kollegen und Kolleginnen des Arbeitskreises für ihre Kooperation, weitreichende Unterstützung bei entstandenen Problemen sowie der Kameradschaft.

Meinen Eltern und der gesamten Familie für ihre Unterstützung während der gesamten Studien- und Promotionszeit.

Frau Vanessa Vogt und Herrn Dr. Jörg Diendorf für die gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit.

Frau Sabine Kiefer für die Abwicklung der Bürokratie.

Frau Brigitte Dietz für die gute Zusammenarbeit im Grundpraktikum.

Daneben danke ich allen Freunden, Verwandten und Bekannten, die mich auf meinem Weg unterstützt haben.